

Université de Montréal

**Développement d'une méthode SPRi pour la quantification
et l'identification régiosélective de protéines cibles dans des
coupes tissulaires biologiques**

Par Simon Laporte

Département de chimie, Université de Montréal
Faculté des arts et des sciences

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures et postdoctorales
en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences (M. Sc.) en chimie

Décembre 2018

© Simon Laporte, 2018

Résumé

Le stade de certaines maladies peut être révélé et suivi par la présence ou la concentration relative de biomolécules spécifiques au sein de tissus ou de fluides biologiques. Cependant, l'identification et la quantification régiosélective de biomolécules restent un défi considérable, pour l'imagerie de tissus lors d'études pathologiques ou d'interactions biomoléculaires. En vue d'atteindre cet objectif, la combinaison de l'imagerie par résonance des plasmons de surface (SPRi) et de l'imagerie par spectrométrie de masse avec désorption-ionisation laser assistée par matrice (MALDI-iMS) a récemment été proposée pour obtenir des images quantitatives et qualitatives à partir d'une seule empreinte tissulaire, sur une seule et même sonde SPRi. Dans cette technique, l'imagerie MALDI-iMS permet l'identification, le séquençage de biomolécules ainsi que la quantification relative, tandis que l'imagerie SPR fournit une quantification cette fois absolue et régiosélective. Cependant, même si ces deux techniques d'imagerie offrent des informations complémentaires sur la quantité absolue de biomatériau adsorbé sur la surface de la sonde avec une résolution spatiale, il reste toujours impossible, avec le design expérimental actuel, de quantifier localement une protéine cible au sein d'un tissu biologique.

Les travaux de ce mémoire présentent les recherches pour le développement d'une méthode reproductible d'imagerie SPR permettant d'obtenir des images quantitatives et régiosélectives de protéines cibles dans des minces coupes tissulaires. La chimie de surface est utilisée afin de greffer un biocapteur spécifique (tel que des anticorps) à la surface de la sonde SPR, pour spécifiquement quantifier une protéine d'intérêt avec régiosélectivité. La quantification et l'identification locale sont effectuées par SPRi lors d'une expérience en deux étapes. Les travaux de ce mémoire portent sur la fonctionnalisation de surface de sonde SPRi sélective, et sur le transfert de protéines cibles à travers une membrane de nylon, d'une coupe tissulaire vers la surface de la sonde.

Mots-clés : Imagerie, Chimie de surface, Résonance des plasmons de surface, SPRi

Abstract

The state of certain diseases can be revealed and monitored by the presence or the relative concentration of specific biomolecule in tissues or biofluids. However, it remains challenging to identify and quantify proteins in biological samples with spatial resolution for imaging of tissues in pathological studies or in biochemical measurements. To achieve this objective, the combination of surface plasmon resonance imaging (SPRi) and matrix assisted laser desorption ionization imaging mass spectrometry (MALDI-iMS) was recently proposed to obtain quantitative and qualitative images from a single tissue imprint, on a single sensor chip. In this technique, MALDI-iMS identify and sequence biomolecules, while SPRi provides absolute and regiospecific quantification. Both imaging techniques give complementary information about the absolute amount and the spatial organization of proteins at the surface of the sensor, but it is still impossible with the current experimental design to locally quantify a specific target protein.

The work presented in this thesis focuses on the development of a reproducible method allowing the regiospecific quantification of target proteins within a thin tissue section. Surface chemistry is used to graft a selective bioreceptor on the surface of the sensor chip (such as antibodies) to specifically quantify a biomolecule with regiospecificity. The local quantification and identification of a target protein is monitored using SPRi, in a two-step assay. This thesis will focus on the functionalization of selective sensor chip surfaces for a targeted protein in different samples, and on the transfer of those proteins from samples to the surface through a nylon membrane.

Keywords : Imaging, Surface plasmon resonance, Surface chemistry, SPRi.

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Table des matières.....	iii
Liste des tableaux.....	v
Liste des figures	vi
Liste des symboles et abréviations.....	xi
Remerciements.....	xiv
Chapitre 1 Introduction.....	1
1.1 Spectroscopie de résonnance des plasmons de surface.....	2
1.1.1 Historique.....	3
1.1.2 Théorie	4
1.1.3 Instrumentation	12
1.1.4 Applications	17
1.2 Biodétection en SPR	18
1.2.1 Les biocapteurs	18
1.2.2 Chimie de surface	19
1.2.3 Quantification du matériel par SPR	26
1.3 Techniques d'imagerie de coupes tissulaires	26
1.3.1 Imagerie par immunohistochimie	27
1.3.2 Imagerie par spectrométrie de masse (MALDI-IMS).....	29
1.4 Objectif de recherche	31
Chapitre 2 Partie expérimentale.....	32
2.1 Préparation des échantillons	32
2.1.1 Immobilisation de protéine cible sur lamelles	32
2.1.2 Préparation des homogénats de foie de souris	32
2.1.3 Préparation des coupes d'homogénats de foie de souris.....	33
2.1.4 Préparation des solutions étalons	34
2.2 Analyses en SPR.....	34
2.2.1 Instrumentation	34

2.2.2	Préparation des capteurs	35
2.2.3	Production de résultats	35
2.3	Analyse en imagerie SPR.....	36
2.3.1	Instrumentation	36
2.3.2	Préparation des capteurs	39
2.3.3	Production d'images SPR	41
Chapitre 3	Développement d'une méthode d'imagerie SPR.....	42
3.1	Étude de fonctionnalisation.....	43
3.1.1	Analyses en SPR	44
3.1.2	Analyses avec l'imageur SPR.....	49
3.2	Étude de transfert de biomatériau au travers une membrane de nylon	51
3.2.1	Étude de transfert avec une fluidique fermée	51
3.2.2	Étude de transfert par dépôt de solution étalon.....	52
3.2.3	Étude de transfert par dépôt d'étalons séchés	54
3.2.4	Étude de transfert par dépôt d'homogénats de foie	69
Chapitre 4	Conclusion	79
4.1	Perspectives.....	80
	Bibliographie.....	83
Chapitre 5	Annexe	i
5.1	Dimensions des prismes utilisés	i
5.2	Plans et dimensions de la cellule fluidique indépendante.....	iii
5.3	Codes Matlab utilisés pour le traitement des données d'imagerie SPR.....	v
5.3.1	Code Minpixhunthr	vi
5.3.2	Code SPRi_Process.....	vii
5.3.3	Code ImageMasse.....	vii
5.3.4	Code Moyenne	vii

Liste des tableaux

Tableau I.	Masse totale de matériel à la surface en fonction du temps pour chaque étalon. .	66
Tableau II.	Masse totale de matériel à la surface en fonction du temps.....	68

Liste des figures

Figure 1.	Champs électrique et magnétique de la lumière. ¹⁴	4
Figure 2.	Réflexion (a) et réfraction (b) de la lumière. ¹⁴	5
Figure 3.	Champ évanescent suite à la pénétration du champ électrique dans le deuxième milieu. ¹⁴	7
Figure 4.	Représentation du phénomène de SPR. Figure tirée des notes de cours CHM 6110 : Chapitres choisis de chimie analytique, Masson J.-F. Automne 2008.	8
Figure 5.	Bande SPR d'une sonde à angle fixe : fraction de la lumière réfléchie en fonction de la longueur d'onde (λ) de celle-ci. ²¹	10
Figure 6.	Déplacement de la bande SPR en fonction de l'indice de réfraction du deuxième milieu. ²²	10
Figure 7.	Excitation théorique des plasmons d'une surface d'or de 50 nm immergée d'eau. Figure tirée des notes de cours CHM 6110 : Chapitres choisis de chimie analytique, Masson J.-F. Automne 2008.	11
Figure 8.	Polarisation de la lumière lors d'une analyse SPR classique. En rouge, la lumière est polarisée P, tandis qu'en bleu elle est polarisée S. ²³	13
Figure 9.	Configuration optique des instruments SPR. (A) : Interrogation de la longueur d'onde, montage à angle fixe. (B) : Interrogation de l'angle, montage à longueur d'onde fixe. ²⁴	13
Figure 10.	(A) Variation de la bande SPR en fonction d'un changement d'indice de réfraction à la surface du prisme. (B) Variation de la longueur d'onde du plasmon en fonction du temps. ²⁴	15
Figure 11.	Schéma d'un imageur SPRi, interrogeant l'intensité lumineuse à angle fixe. ²	16
Figure 12.	Illustration du phénomène d'absorption non spécifique sur une sonde SPR, lors de l'injection d'un analyte en matrice complexe. ²⁴	19
Figure 13.	Illustration du phénomène d'adsorption non spécifique sur une sonde SPR fonctionnalisée par une monocouche auto-assemblée, lors de l'injection d'un analyte en matrice complexe. ²⁴	20

Figure 14.	3-MPA-[(Leu)(His)(Asp)] ₂ -OH, ou LHDLDH ; Peptide développé dans les laboratoires du professeur Masson étant efficace à réduire l'adsorption non spécifique du sérum. ⁴⁸	23
Figure 15.	Réaction illustrant le couplage de la monocouche peptidique avec un anticorps. Les boules rouges représentent la chaîne peptidique, tandis que les boules bleues représentent l'anticorps.	24
Figure 16.	Désactivation d'un site d'ancrage par une réaction avec l'éthanolamine.....	25
Figure 17.	Différentes étapes de fonctionnalisation d'une sonde SPR par chimie de surface. À la fin est obtenu un biocapteur SPR, spécifique à l'antigène relatif à l'anticorps ancré.....	25
Figure 18.	Détection de la protéine <i>p21</i> au sein d'un poumon humain cancéreux. La coloration brune révèle l'emplacement de la protéine. ⁵²	28
Figure 19.	Images MALDI d'une coupe d'un rein de souris d'une épaisseur de 20 µm. Chaque image représente l'intensité d'un ratio m/z différent, selon leur emplacement dans le tissu. ¹	30
Figure 20.	À droite, P4SPR d'Affinité instruments, et à gauche, schéma démontrant le système d'injection dans une cellule fluide sur un prisme à l'intérieur d'un P4SPR. ¹⁴	35
Figure 21.	SPRi-Lab+, instrument d'imagerie SPR d'Horiba ⁶⁸	36
Figure 22.	Cellules fluidiques pour l'imageur SPR. À gauche, la cellule d'origine d'un volume d'environ 0,2 mL, et à droite, la cellule conçue pour le projet (l'ouverture au centre est de 10 mm par 10 mm).....	38
Figure 23.	Cellule fluide indépendante conçue afin de fonctionnaliser la surface d'or. À gauche, la cellule fermée, permettant les injections successives, et à droite, la cellule ouverte.	38
Figure 24.	Configuration finale de l'imageur d'Horiba SPRi-Lab+. ²³	39
Figure 25.	Schéma du biocapteur SPRi. ²³	41
Figure 26.	Images obtenues d'un même rein de souris grâce à la méthode développée au sein du groupe Masson. À gauche, une image MALDI-iMS, au milieu, le tissu coloré à l'hématoxyline et à l'éosine, et à droite, une image SPR. ¹	42
Figure 27.	Fonctionnalisation d'une sonde sans fluide fermée. Les solutions sont ajoutées et drainées les unes après les autres sur la sonde à l'aide d'une micropipette, et sont laissées à réagir avec la monocouche auto-assemblée.....	45

Figure 28.	Sensogramme SPR typique obtenu pour un test contrôle. Ici, la surface est recouverte du peptide LHDLHD, et est ensuite fonctionnalisée pour devenir un biocapteur spécifique à l'IgG.....	46
Figure 29.	Deux exemples de sensogrammes obtenus pour des tests de fonctionnalisation hors fluide. Ici, les surfaces sont recouvertes du peptide LHDLHD, et une solution d'anti-IgG est déposée à la surface en vue de la fonctionnalisation.	47
Figure 30.	Courbe d'étalonnage d'IgG, obtenue à l'aide de l'imageur SPR ($R^2 = 0,978$). La sonde SPR est fonctionnalisée avec la cellule fluide indépendante.....	48
Figure 31.	Courbe d'étalonnage d'hémoglobine obtenue à l'aide de l'imageur SPR ($n = 3$, $R^2 = 0,989$).	49
Figure 32.	Transfert d'une coupe de rein de souris à travers une membrane de nylon vers une sonde SPRi. 1) la coupe tissulaire, montée sur une lamelle de microscope est déposée sur la sonde, séparée d'une membrane de nylon humectée de PBS. 2) Le transfert de biomolécules s'effectue au travers de la membrane, de façon à limiter la diffusion latérale. 3) La lamelle et la membrane sont retirées, et l'empreinte du rein reste sur la sonde.	50
Figure 33.	Membrane de nylon déposée sur une sonde d'imagerie SPR avant de sceller celle-ci dans la fluide d'appareil d'imagerie.	52
Figure 34.	Dépôt d'une solution étalon sur une sonde d'imagerie SPR, sur laquelle est déposée une membrane de nylon. Celle-ci est scellée dans l'imageur SPR à l'aide de la cellule ouverte.	53
Figure 35.	Sensogramme SPR observé après le dépôt d'une solution étalon de 1000 nM à l'intérieur de la cellule ouverte.	54
Figure 36.	Image SPR de 25 μ L d'étalon hémoglobine (5000 nM) séchés sur une lamelle et passés au travers une membrane de nylon. La sonde d'imagerie SPR est fonctionnalisée avec de l'anti-hémoglobine. L'échelle de couleur est en ng/cm^2	55
	Image SPR de 25 μ L d'étalon hémoglobine (1000 nM) séchés sur une lamelle et passés au travers une membrane de nylon. La sonde d'imagerie SPR est fonctionnalisée avec de l'anti-hémoglobine. L'échelle de couleur est en ng/cm^2	57
Figure 37.	57

Figure 38.	Images SPR de 25 μ L d'étalon hémoglobine (5000 nM) séchés sur une lamelle et passés au travers une membrane de nylon. La sonde d'imagerie SPR est fonctionnalisée avec de l'anti-hémoglobine. Les échelles sont en ng/cm^2	58
Figure 39.	Images SPR de 25 μ L d'étalon hémoglobine (5000 nM) séchés sur une lamelle et passés au travers une membrane de nylon. La sonde d'imagerie SPR est fonctionnalisée avec de l'anti-PSA. Les échelles sont en ng/cm^2	60
Figure 40.	Images SPR de 25 μ L de PBS 7,4 séchés sur une lamelle et passés au travers une membrane de nylon. La sonde d'imagerie SPR n'est pas fonctionnalisée. Les échelles sont en ng/cm^2	62
Figure 41.	Images SPR de 5 μ L d'étalon d'hémoglobine 1000 nM séchés sur une lamelle et passés au travers une membrane de nylon. La sonde d'imagerie SPR n'est pas fonctionnalisée. Les échelles sont en ng/cm^2	64
Figure 42.	Images SPR de 5 μ L d'étalon d'hémoglobine 10 nM séchés sur une lamelle et passés au travers une membrane de nylon. La sonde d'imagerie SPR n'est pas fonctionnalisée. Les échelles sont en ng/cm^2	65
Figure 43.	Images SPR de 5 μ L d'étalon d'hémoglobine 1000 nM séchés sur une lamelle et passés au travers une membrane de polycarbonate. La sonde d'imagerie SPR n'est pas fonctionnalisée. Les échelles sont en ng/cm^2	67
Figure 44.	Images SPR d'homogénats de foie passant au travers une membrane de nylon. La surface est fonctionnalisée avec de l'anti-IgG. À gauche : échantillons sans IgG. À droite : échantillon enrichi d'IgG (5000 nM).	70
Figure 45.	Masse absolue mesurée à chaque image SPR en fonction du temps. La série bleue représente l'échantillon enrichi avec l'IgG, et la série orange représente l'échantillon sans IgG.	71
Figure 46.	Deuxième analyse : Images SPR d'homogénats de foie passant au travers une membrane de nylon. La surface est fonctionnalisée avec de l'anti-IgG. À gauche : échantillons sans IgG. À droite : échantillon enrichi d'IgG (5000 nM).	72
Figure 47.	Deuxième analyse : Masse absolue mesurée à chaque image SPR en fonction du temps. La série bleue représente l'échantillon enrichi avec l'IgG, et la série orange représente l'échantillon sans IgG.	73

Figure 48.	Troisième analyse : Images SPR d'homogénats de foie passant au travers une membrane de nylon. La surface est fonctionnalisée avec de l'anti-IgG. À gauche : échantillons sans IgG. À droite : échantillon enrichi d'IgG (5000 nM).	74
Figure 49.	Troisième analyse : Masse absolue mesurée à chaque image SPR en fonction du temps. La série bleue représente l'échantillon enrichi avec l'IgG, et la série orange représente l'échantillon sans IgG.	75
Figure 50.	Quatrième analyse : Images SPR d'homogénats de foie passant au travers une membrane de nylon. La surface est fonctionnalisée avec de l'anti-IgG. À gauche : échantillons sans IgG. À droite : échantillon enrichi d'IgG (5000 nM).	76
Figure 51.	Quatrième analyse : Masse absolue mesurée à chaque image SPR en fonction du temps. La série bleue représente l'échantillon enrichi avec l'IgG, et la série orange représente l'échantillon sans IgG.	77
Figure 52.	Représentation de nanopiliers d'or sur une surface de prisme d'imagerie SPR. À gauche, disposition périodique des piliers sur la surface (cette figure n'est pas à l'échelle). À droite, déposition d'échantillon sur un prisme comportant des nanopiliers.	81
Figure 53.	Schéma des primes utilisé dans l'instrument d'imagerie SPR.....	i
Figure 54.	Schémas des prismes utilisés dans l'instrument P4 SPR.	ii
Figure 55.	Plans et dimensions de la partie inférieure de la cellule fluïdique indépendante.	iii
Figure 56.	Plans et dimensions de la partie supérieure de la cellule fluïdique indépendante.	iv
Figure 57.	Assemblage de la cellule fluïdique indépendante.	v

Liste des symboles et abréviations

16-MHA	Acide mercaptohexadécanoic
c	Vitesse de la lumière
CCD	Dispositif à couplage de charge
DMF	Diméthylformamide
E	Champs électriques
EDC	1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide
H	Champs magnétiques
I	Intensité lumineuse
I₀	Intensité lumineuse initiale
IgG	Immunoglobuline Gamma
IMS	Imagerie par spectrométrie de masse
k₀	Vecteur d'onde de la lumière
K_A	Constante d'association
k_{sp}	Vecteur d'onde du plasmon de surface
LED	Diode électroluminescente
m	Masse

MALDI	Désorption-ionisation laser assistée par matrice
MS	Spectrométrie de masse
n	Indice de réfraction
NHS	N-hydroxysuccinimide
PBS	Tampon de phosphate salin
PDMS	Polydiméthylsiloxane
RPM	Rotation par minute
RTI	Réflexion totale interne
SAM	Monocouche auto-assemblée
SPR	Résonnance des plasmons de surface
SPRi	Imagerie par résonnance de plasmons de surface
z	Degré d'ionisation
ϵ	Constante diélectrique
θ	Angle
λ	Longueur d'onde
ω	Fréquence angulaire

“Everybody is a genius. But if you judge a fish by its ability to climb a tree, it will live its whole life believing that it is stupid.”

- Albert Einstein

Remerciements

J'aimerais d'abord et avant tout remercier ma famille de m'avoir soutenu, moralement, physiquement, spirituellement, et même financièrement durant la totalité de mon parcours universitaire. Surtout mes parents, pour m'avoir toujours appuyé dans tous mes choix (même les plus déraisonnables), saluant au passage chacune de mes réalisations, sans trop savoir plus que moi si un jour ça allait m'amener quelque part. Aussi, mon grand-frère Jean-Louis, sur qui j'ai toujours pu compter, et qui a su être un confident exceptionnel et un frère des plus vrai, malgré parfois les quelque 4500 km de distance (la TV pi les égouts, c'est tout ce qui nous réunis, d'un océan à l'autre !).

Je tiens aussi à remercier les amis et les amies que j'ai eu la chance de découvrir durant mes 6 (presque 7) années passées à l'Université de Montréal. Bien sûr les Gringos, pour toutes ces soirées relaxantes et apaisantes passées ensemble qui ont permis de colorer ma vie universitaire et de faciliter les fins de session (on aurait vraiment dû se faire un scrapbook). Merci aux Pura Vie d'anges, avec qui j'ai passé le plus ressourçant des voyages, me permettant de réintégrer plus facilement ma maîtrise après une année sabbatique. Évidemment, merci à Benoit Miron et Stéphanie Juteau, pour l'hospitalité toujours aussi impeccable les soirs de semaine.

Je voudrais remercier aussi toutes les personnes avec qui j'ai eu la chance de travailler et de collaborer dans le cadre de mon implication étudiante, au sein de l'AÉDCUM et de la FAÉCUM. L'implication étudiante fut au cœur de mon parcours universitaire, et compte parmi l'expérience la plus enrichissante que j'ai pu acquérir à l'Université. Un merci particulier à Simon Forest, d'avoir été mon président durant mon premier mandat à l'AÉDCUM, et d'avoir été mon secrétaire général durant mon mandat à la FAÉCUM. Ton leadership a toujours été inspirant, merci de m'avoir convaincu à embarquer dans la plus belle expérience de ma vie qu'a été le mouvement étudiant. Merci aussi à l'entièreté de l'équipe de la FAÉCUM pour mon mandat 2017-2018, vous êtes maintenant comme une deuxième famille pour moi, et j'espère que nos fous rires traverseront l'épreuve du temps.

Finalement, je veux remercier mon directeur de recherche, Jean-François Masson, ainsi que tous les membres du groupe avec qui j'ai eu la chance de travailler. Jean-François, merci

d'être un directeur de recherche aussi attentif et compréhensif. Malgré les embûches de mon projet de recherche, ton soutien et ton optimisme face aux différentes épreuves rencontrées m'ont toujours motivé à continuer et à aller plus loin. Merci aussi de m'avoir permis de m'épanouir au travers l'implication étudiante, quand toutes ces heures investies dans l'association étudiante auraient dû être des heures de labo. Tu m'as malgré tout laissé la chance de me lancer dans l'incroyable aventure qu'est un mandat à la FAÉCUM, pour ensuite me laisser reprendre mon projet, et je t'en suis énormément reconnaissant. Merci aux membres du groupe avec qui j'ai toujours pu échanger autour des différents projets de recherche, Julien, Alexe, Hugo-Pierre, Félix, Benjamin, Jérémie, Marie-Pier, Geneviève, Thibault, Maxime, Simon. Merci aussi aux collaborateurs qui m'ont aidé au travers ma maîtrise ; Jean-François Myre et Martin Lambert de l'atelier mécanique, ainsi que le professeur Pierre Chaurand, avec qui le projet a été élaboré.

Je tiens finalement à souligner l'apport de tout le monde que j'ai pu côtoyer durant mes 6 années à l'Université de Montréal, pour avoir fait de ces années les plus belles de ma vie.

Chapitre 1 Introduction

La biodétection consiste à détecter ou mesurer la présence de biomolécules à l'aide d'une sonde d'origine biologique. L'interaction spécifique entre l'analyte et les biomolécules à la surface de la sonde cause des changements physico-chimiques, qui sont transformés en signal physique quantifiable. Les termes biocapteur ou biodétection furent introduits dans les années 70 avec l'arrivée de l'utilisation de transducteurs pour la détection directe de biomolécules sur des surfaces fonctionnalisées. Inévitablement, l'intérêt de la recherche pour ce domaine ne fait que grandir, étant donné les innombrables retombées possibles allant du diagnostic rapide jusqu'à l'étude de biointeractions en matrice complexe. L'énorme étendue du domaine de la biodétection en fait donc un domaine de recherche très dynamique, touchant une multitude de principes analytiques, et donnant parfois naissance à de puissants outils de diagnostic.

L'exemple de biocapteur le plus connu jusqu'à ce jour reste le glucomètre. Celui-ci permet aux patients atteints de diabète de suivre leur taux de glucose de façon simple et indépendante. En effet, le glucomètre transforme le glucose dans l'échantillon de sang en peroxyde d'hydrogène suite à une réaction enzymatique à l'intérieur de celui-ci. Le peroxyde d'hydrogène produit est ensuite oxydé à une électrode, et donc le signal électrique produit est proportionnel à la quantité de glucose dans le sang. Dans ce cas-ci, l'enzyme (souvent une glucose oxydase) est l'élément de reconnaissance, étant spécifique au glucose, et l'électrode fait office de transducteur, transformant la réponse chimique en signal électrique mesurable.

L'immunohistochimie est une technique de biodétection fréquemment utilisée pour les diagnostics de cancers ou de diverses pathologies. En effet, cette technique utilise des anticorps et des marqueurs fluorescents/colorés afin de donner des informations sur la localisation de protéines spécifiques dans un tissu biologique, permettant de mesurer la présence, l'accumulation ou la diminution de la concentration de ces dites protéines. Cependant, ces techniques nécessitent un marquage des biomolécules et parfois même une amplification chimique ce qui augmente le niveau de complication des analyses. De plus, les manipulations effectuées lors du marquage des biomolécules cibles augmentent les risques pour le pathologiste d'introduire des artéfacts. Une technique pouvant donc quantifier des biomolécules cibles en

fonction de leur emplacement dans un tissu, sans avoir à préalablement marquer celles-ci, faciliterait la tâche aux pathologistes lors des diagnostics.

La spectroscopie de résonnance des plasmons de surface (SPR) est une technique permettant entre autres la quantification absolue de biomolécules à la surface d'un capteur. De plus, il est connu que la SPR peut être utilisée en imagerie afin de permettre le multiplexage, ou encore l'étude quantitative de coupe tissulaire.¹⁻³ La combinaison de l'immunohistochimie à l'imagerie SPR permettrait l'obtention de résultats quantitatifs, qualitatifs et régiosélectifs, sous la forme d'images. Ici, le terme régiosélectif veut dire que les images obtenues comporteraient une sélectivité spatiale, en deux dimensions. Il est important de ne pas confondre avec le terme régiosélectif utilisé en stéréochimie, lequel est utilisé pour décrire une réaction chimique où les réactifs réagissent préférentiellement avec certains sites d'un autre réactifs parmi plusieurs. En aucun cas dans ce mémoire cette définition du terme n'est sollicitée.

Les travaux de ce mémoire porteront donc sur la fabrication d'un biocapteur utilisé en imagerie SPR, lequel serait spécifique, grâce à des anticorps, à une protéine cible présente dans une coupe tissulaire ou d'homogénat. Les travaux porteront aussi sur le développement d'une méthode d'imagerie SPR simple, reproductible et sans marquage, capable d'offrir des images quantitatives, qualitatives et régiosélectives de protéines cibles. Ultimement, la méthode développée a pour but d'être couplée à l'imagerie par spectrométrie de masse avec désorption-ionisation laser assistée par matrice (MALDI), ce qui donnerait encore plus d'informations sur la nature des biomolécules à la surface du capteur. La première partie de ce mémoire est dédiée aux contextes théorique et historique, ainsi qu'à l'instrumentation utilisée lors de la réalisation de ce mémoire.

1.1 Spectroscopie de résonnance des plasmons de surface

La spectroscopie de résonnance des plasmons de surface (SPR) est au cœur des travaux effectués dans ce mémoire. En effet, les résultats présentés dans ce mémoire sont pour la plupart issus d'un imageur SPR, ainsi que d'un appareil SPR à injection successive. Ces instruments sont exposés en plus amples détails dans le chapitre 2, soit la partie expérimentale. Ici sont donc discutés les concepts plus généraux attribués à l'historique et la théorie de la spectroscopie SPR, afin de bien comprendre les particularités de cette technique.

1.1.1 Historique

L'observation des phénomènes de résonnance des plasmons de surface peut remonter jusqu'au IV^e siècle, avec la coupe de Lycurgue. Cette coupe, datant de l'Empire romain et aujourd'hui conservée au British Museum à Londres, est constituée de verre dichroïque, et donc a la particularité de changer de couleur selon le point de vue de l'observateur. De fait, la lumière diffusée par la coupe est d'un vert opaque, tandis que la lumière transmise est plutôt rouge. Ceci est dû aux nanoparticules d'or et d'argent dispersées dans le verre qui absorbent différentes longueurs d'onde de la lumière en fonction de leur taille.⁴ La résonnance des plasmons localisés à la surface des nanoparticules est directement responsable de ce phénomène. Il fallut cependant attendre jusqu'au XX^e siècle pour que la communauté scientifique cerne bien le phénomène.

Le phénomène de résonnance des plasmons de surface a pour la première fois été décrit par Wood, en 1902, après que celui-ci aie observé une diffraction anormale de la lumière réfléchi sur un réseau de diffraction.⁵ L'interprétation physique complète du phénomène est toutefois restée inconnue jusqu'en 1968, lorsque, durant la même année, Otto⁶ et Kretschmann⁷ rapportent l'excitation des plasmons de surfaces. La technologie et l'appareillage se sont développés dans les années suivantes, faisant de la SPR une technique très prometteuse en spectroscopie analytique. C'est donc en 1983 que le concept de biodétecteur à base de la technologie SPR a vu le jour, dans les laboratoires de Liedberg.⁸ Depuis, les avancées technologiques dans le domaine de la SPR fusent de partout à travers le monde, faisant de la SPR un incontournable dans le domaine de la biodétection. En effet, la simplicité instrumentale, la non-nécessité de marquage de l'analyte et la rapidité d'acquisition de données font de la SPR une technique de choix auprès de la communauté scientifique.

L'imagerie SPR (SPRi) compte parmi ces avancées technologiques, et a été développée vers la fin des années 80 dans les laboratoires de Ash⁹ et Knoll¹⁰. Ces derniers avaient pour but d'étudier la morphologie de surface d'une monocouche de phospholipide par microscopie SPR, soit essentiellement de la SPRi. Par la suite, soit 10 ans plus tard, la SPRi fait son apparition dans la littérature comme technique de biodétection, ou pour des études de bioaffinité, avec les recherches de Corn¹¹⁻¹³, visant principalement la détection et la caractérisation d'oligonucléotides sur des surfaces d'or fonctionnalisées. Finalement, c'est à la toute fin des années 90 que les appareils SPRi voient leur sensibilité et leur résolution considérablement

augmenter grâce à l'ajout des sources lumineuses en proche infrarouge. Depuis, la SPRi s'est établie comme une technique importante dans le domaine de la biodétection et du multiplexage, due encore une fois à sa simplicité, sa non-nécessité de marquage, et sa capacité à collecter des données, en temps réel, sur plusieurs composés à la fois.

1.1.2 Théorie

Avant d'entrer de façon rigoureuse dans la physique du phénomène de SPR, il est nécessaire de faire un bref rappel sur quelques principes fondamentaux entourant la spectroscopie, et donc la lumière. Rappelons que la lumière est une onde électromagnétique possédant des caractéristiques à la fois d'onde et de particule. En effet, les photons sont les particules constituant la lumière, possédant une masse infiniment petite et voyageant à vitesse constante dans un milieu donné (environ 3×10^8 m/s dans le vide). Les photons possèdent une longueur d'onde (λ) avec un champ magnétique (H) et électrique (E) voyageant en phase, orthogonalement entre eux et envers la direction de propagation commune.

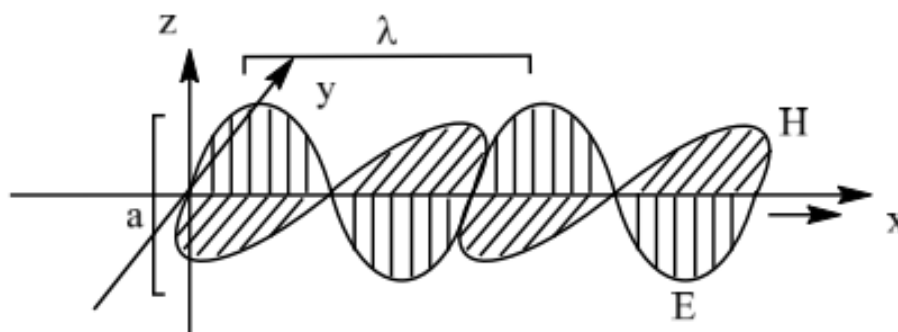


Figure 1. Champs électrique et magnétique de la lumière.¹⁴

Un faisceau lumineux est donc composé d'une infinité de photons, tous oscillant à la même longueur d'onde, vers une même direction. Cependant, les oscillations des photons ne se font pas dans le même plan, et donc chaque photon présente une contribution différente au champ électrique résultant. Statistiquement, due à l'infinité de photons oscillant dans tous les plans, la résultante du champ électrique est nulle (chaque oscillation se voit annulée par une contre oscillation, de la même amplitude, mais dans la direction opposée). La lumière ayant un

champ électrique résultant non nul est en fait de la lumière dite polarisée. La polarisation de la lumière viendra imposer une direction d'oscillation du champ électrique. Si cette polarisation reste dans un seul et même plan, la lumière est dite polarisée linéairement. Il existe d'autres types de polarisation plus complexes, tels que les polarisations elliptique ou circulaire, ou justement l'oscillation du champ électrique ne se fait pas toujours dans le même plan. Cependant, seule la polarisation linéaire est mise à profit en spectroscopie SPR, et donc il est inutile ici de s'attarder aux autres types.

Habituellement, la lumière se propage en ligne droite à partir d'une source lumineuse. Il est possible de contrôler la trajectoire de la lumière en faisant dévier celle-ci, dans la plupart des cas par réflexion ou réfraction. Une réflexion survient lorsque la lumière frappe une surface réfléchissante. Celle-ci est alors réfléchie, dans la direction opposée, avec le même angle par rapport à la normale que l'angle d'incidence ($\theta_{\text{inc}} = \theta_{\text{ref}}$), tout en conservant son intensité lumineuse. Pour ce qui est de la réfraction, celle-ci survient lorsque la lumière passe d'un milieu à un autre ayant une densité optique différente. La densité optique d'un matériau, soit son indice de réfraction, indique le rapport de la vitesse de la lumière dans le matériau par rapport à la vitesse de la lumière dans le vide. De fait, le passage d'un faisceau lumineux du vide vers un matériau aura pour effet de diminuer la vitesse de celui-ci, d'un facteur exprimé par l'indice de réfraction (n).

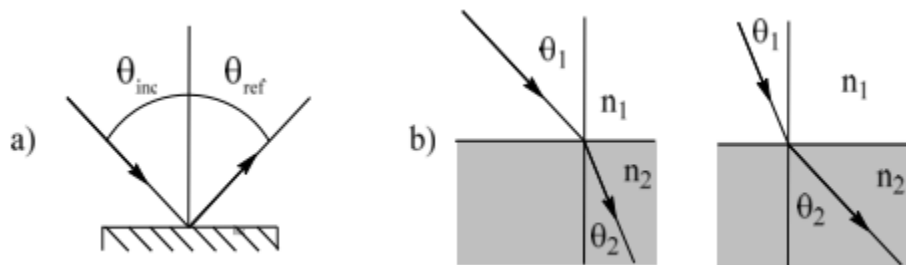


Figure 2. Réflexion (a) et réfraction (b) de la lumière.¹⁴

Lors d'une réfraction, la relation entre les angles d'incidence (θ_1) et de réfraction (θ_2), par rapport à la normale, est donnée par la loi de Snell-Descartes.

$$n_1 \sin \theta_1 = n_2 \sin \theta_2 \quad (1)$$

L'indice de réfraction d'un matériau peut varier en fonction de la température de celui-ci, ainsi qu'en fonction de la longueur d'onde de la lumière incidente. À la figure 2, il est donc possible de remarquer que lorsque la lumière traverse vers un milieu ayant un indice de réfraction plus élevée, l'angle sortant (θ_2) est plus petit que l'angle entrant (θ_1) (figure 2 b) à gauche) et inversement (figure 2 b) à droite). Il est aussi important de noter qu'une partie du faisceau lumineux, au contact de l'interface entre les deux milieux, sera réfléchi et non réfracté. L'intensité de la lumière réfléchi peut dépendre de l'angle d'incidence, la polarisation ou bien des indices de réfraction des milieux. Un phénomène particulier se produit lorsque la lumière passe d'un milieu moins réfringent vers un plus réfringent ($n_1 > n_2$), avec un angle d'incidence plus grand qu'un certain angle, soit l'angle critique (θ_c). De fait, si ces conditions sont retrouvées, le faisceau lumineux restera confiné dans le premier milieu, et donc sera totalement réfléchi. Ce phénomène se nomme réflexion totale interne (RTI). Si les indices de réfraction des deux milieux sont connus, il est facile de déterminer l'angle critique simplement à partir de la loi de Snell-Descartes.

$$\theta_c = \arcsin\left(\frac{n_2}{n_1}\right) \quad (2)$$

Lors d'une réflexion totale interne, bien que le faisceau lumineux soit totalement réfléchi par l'interface entre les 2 milieux, le champ magnétique ou électrique des photons de celui-ci peut traverser d'un milieu à l'autre, sur une distance de quelques dizaines de nanomètres, produisant une onde électromagnétique de l'autre côté de l'interface. Cette onde, appelée aussi champ évanescent, verra son amplitude décroître de façon exponentielle en fonction de la distance à l'interface. Si une molécule se trouve à cet endroit précis, elle pourra absorber la lumière, et donc le faisceau lumineux réfléchi n'aura pas la même intensité que le faisceau lumineux incident.

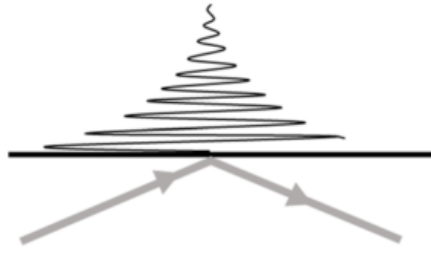


Figure 3. Champ évanescent suite à la pénétration du champ électrique dans le deuxième milieu.¹⁴

En utilisant de la lumière polarisée, il est possible de choisir entre le champ magnétique et le champ électrique, lequel pénétrera dans le deuxième milieu. Si la lumière est polarisée de façon à ce que le champ électrique soit dans le même plan que l'interface, alors le champ électrique ne pénètre pas dans le deuxième milieu, tandis que le champ magnétique y pénètre. Cette onde est appelée transverse électrique (TE), ou de polarisation S. Inversement, si le champ magnétique est dans le même plan que l'interface, c'est alors le champ électrique qui pénètre dans le second milieu. Cette onde est nommée transverse magnétique (TM), ou de polarisation P.

Toutes ces notions sont nécessaires afin de bien comprendre le phénomène de SPR. En effet, la SPR utilise l'interaction entre la lumière et les plasmons aux surfaces de minces films métalliques afin de sonder la constante diélectrique à l'interface de ceux-ci.¹⁵ La constante diélectrique, qui exprime en fait la réponse d'un milieu donné face à un champ électrique appliqué, est directement liée à l'indice de réfraction, par la relation suivante :

$$\varepsilon = \eta^2 \quad (3)$$

Où (ε) représente la constante diélectrique, et (η) représente l'indice de réfraction de ce diélectrique. La capacité de la SPR à être sensible aux changements d'indice de réfraction fait d'elle une technique presque universelle. Tel que mentionné, cette capacité provient directement de l'interaction de la lumière avec les plasmons de surfaces. Plus précisément, les plasmons sont le produit de l'oscillation collective des électrons à l'interface d'un conducteur et d'un diélectrique. Il est possible de les comparer aux vagues sur la surface d'un plan d'eau ; tout comme les vagues, l'oscillation des électrons à la surface produit une onde électromagnétique,

qui se propage de façon localisée sur la surface. À cette onde est associé un champ électromagnétique, dont le vecteur est à son maximum à l'interface, et décroît exponentiellement de façon perpendiculaire à celui-ci.

Sachant que l'onde électromagnétique à la surface du métal est de traverse magnétique (polarisation P), c'est donc dire que celle-ci a la capacité d'absorber les photons de polarisation P ayant un vecteur d'onde identique. En effet, la lumière incidente peut entrer en résonance avec le plasmon de surface si certaines conditions très spécifiques sont respectées ; que les vecteurs d'ondes et la polarisation de la lumière incidente et du plasmon soient identiques, et que la portion réelle de la constante diélectrique du métal soit négative.¹⁶

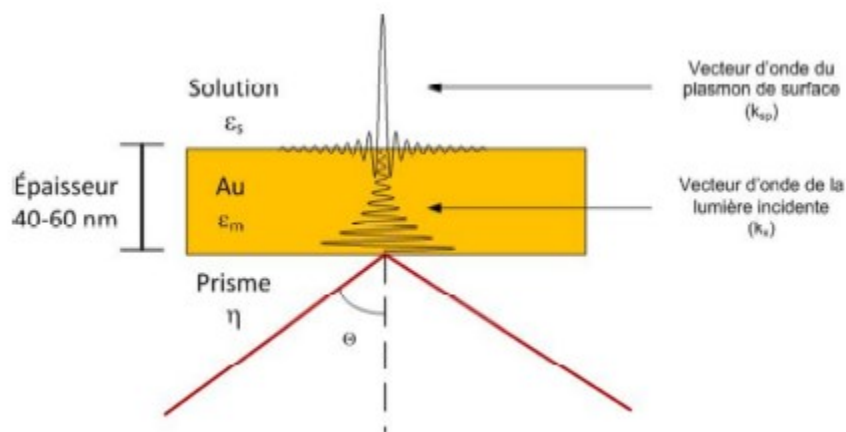


Figure 4. Représentation du phénomène de SPR. Figure tirée des notes de cours CHM 6110 : Chapitres choisis de chimie analytique, Masson J.-F. Automne 2008.

Cependant, sachant que le vecteur d'onde de la lumière se propageant dans l'eau ou dans l'air sera toujours plus petit que le vecteur d'onde d'un plasmon excité, il est nécessaire de faire appel au phénomène de RTI. En effet, le vecteur d'onde de la lumière augmente lorsque celle-ci se retrouve en situation de RTI dans un milieu plus réfringent.¹⁷ Les vecteurs d'onde de la lumière incidente en RTI (k_x) et du plasmon de surface (k_{sp}) sont exprimés par les équations suivantes :

$$k_{sp} = k_0 \sqrt{\frac{\epsilon_m \epsilon_s}{\epsilon_m + \epsilon_s}} \quad (4)$$

$$k_x = k_0 n_D \sin \theta_{inc} \quad (5)$$

$$k_0 = \frac{\omega}{c} = \frac{2\pi}{\lambda} \quad (6)$$

Ou ϵ_m et ϵ_s représentent respectivement les constantes diélectriques du métal et du diélectrique, k_0 représente le vecteur d'onde de la lumière incidente, n_D indique l'indice de réfraction du premier milieu (celui dans lequel se produit la RTI), θ_{inc} est l'angle d'incidence de la lumière, ω la fréquence angulaire de celle-ci et finalement λ exprime sa longueur d'onde. Dans le cas ou $k_x = k_{sp}$, le photon de la lumière incidente pourra être absorbé par le plasmon, et donc l'indice de réfraction du milieu diélectrique sera sondé. Si l'indice de réfraction du milieu diélectrique (par exemple une solution quelconque) change, le vecteur d'onde du plasmon changera, et donc pour y avoir résonance, le vecteur d'onde de la lumière devra changer aussi. Il est donc possible, en excitant le plasmon de surface avec de la lumière, de mesurer l'indice de réfraction de la solution.

Tel que mentionné plus haut, la nature du métal utilisé est très importante. En effet, la portion réelle de la constante diélectrique de celui-ci se doit d'être négative afin de supporter un plasmon de surface. Plusieurs métaux répondent à cette caractéristique, notamment l'or, l'argent, le cuivre, le platine, le palladium et l'aluminium.^{18, 19} Parmi ces métaux, l'argent se démarque comme étant le métal offrant la meilleure sensibilité. Cependant, celui-ci s'oxyde facilement au contact de l'air. Le meilleur choix reste donc l'or, qui lui est inerte aux conditions ambiantes, en plus d'offrir aussi une sensibilité considérable.²⁰

De façon résumée, lorsqu'un faisceau lumineux polychromatique est dirigé, au travers d'un prisme d'indice de réfraction élevé, vers une mince surface d'or, les photons ayant la bonne longueur d'onde seront absorbés par le plasmon tandis que les autres seront réfléchies vers le détecteur par RTI. En traçant un graphique de la fraction de lumière réfléchie en fonction de la longueur d'onde, une courbe est obtenue dont le minium de lumière réfléchie correspond à la longueur à laquelle les photons sont le plus absorbés, et donc à la longueur d'onde du plasmon.

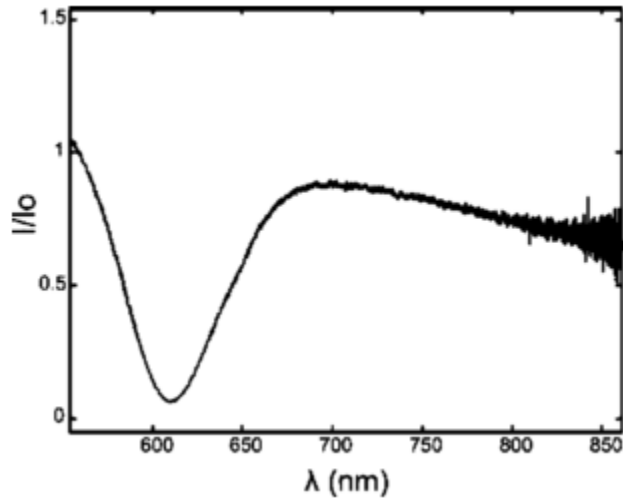


Figure 5. Bande SPR d'une sonde à angle fixe : fraction de la lumière réfléchiée en fonction de la longueur d'onde (λ) de celle-ci.²¹

Lorsque l'indice de réfraction du deuxième milieu (à l'extérieur du prisme, de l'autre côté du film d'or) change, due par exemple à la liaison d'une molécule, le vecteur d'onde du plasmon change aussi, et donc celui-ci absorbe les photons de différentes longueurs d'onde que précédemment. Encore une fois, sur un graphique exprimant l'intensité lumineuse (I/I_0) en fonction de la longueur d'onde, un changement d'indice de réfraction du deuxième milieu se traduira par un déplacement de la bande SPR.

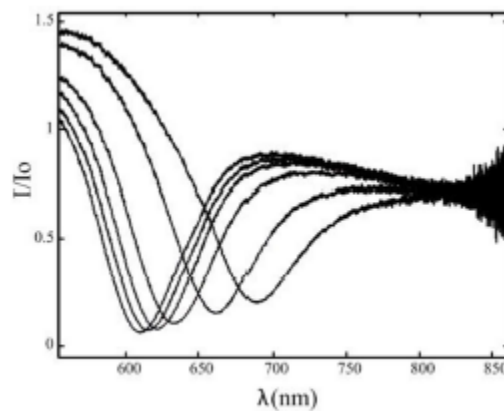


Figure 6. Déplacement de la bande SPR en fonction de l'indice de réfraction du deuxième milieu.²²

Maintenant, il est important de mentionner le fait que l'angle d'incidence comporte un paramètre tout aussi important que la longueur d'onde. De fait, basé sur les facteurs exprimés

dans les équations (4), (5) et (6), il est possible de remarquer que plusieurs d'entre eux sont invariables pour un système donné. Effectivement, l'indice de réfraction du prisme, l'épaisseur du métal ainsi que la nature de celui-ci, et finalement la nature du deuxième milieu (souvent la solution dans laquelle la sonde SPR est immergée), restent constants. Seulement deux facteurs restent donc variables pour satisfaire l'équation, soit la longueur d'onde (λ) et l'angle d'incidence (θ_{inc}). Ce qui veut donc dire qu'en pratique, il existe deux façons d'exciter un plasmon ; en faisant varier la longueur d'onde à un angle d'incidence constant, tel que démontré aux figures 5 et 6, ou bien en faisant varier l'angle d'incidence tout en gardant la longueur d'onde constante. Dans un tel cas, le spectre obtenu aurait la même allure que les spectres des figures 5 et 6, à la seule différence que l'axe des abscisses représenterait l'angle d'incidence et non la longueur d'onde. Avec un faisceau de lumière monochromatique, le minimum de la bande correspondrait à l'angle d'incidence où l'absorption est maximale. L'intensité lumineuse réfléchie, la longueur d'onde ainsi que l'angle d'incidence sont donc trois facteurs intrinsèquement liés pour un même système SPR, tel que démontré à la figure 7.

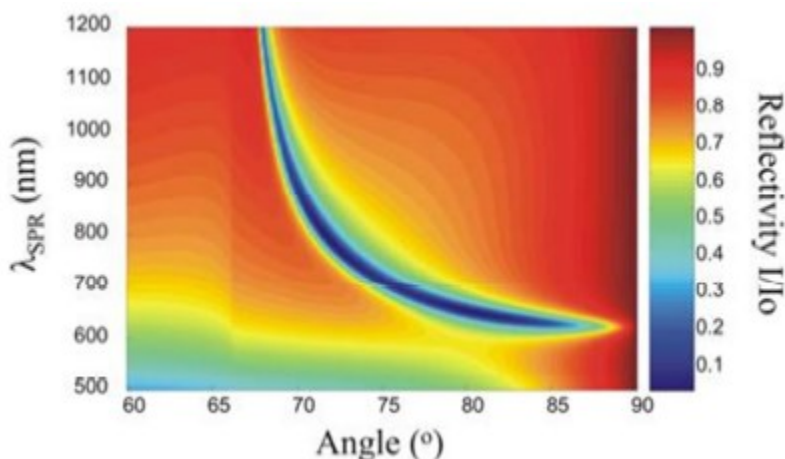


Figure 7. Excitation théorique des plasmons d'une surface d'or de 50 nm immergée d'eau. Figure tirée des notes de cours CHM 6110 : Chapitres choisis de chimie analytique, Masson J.-F. Automne 2008.

Un aspect important de la spectroscopie SPR provient dans le fait que la sensibilité réside dans la position de la bande SPR en fonction de l'abscisse, et non de l'intensité lumineuse réfléchie vers le détecteur ou absorbée. Les méthodes mathématiques permettant de déterminer avec précisions le minimum d'une courbe sont bien établies, ce qui offre aux appareils SPR une

bonne sensibilité sans l'utilisation de source lumineuse puissante. Cependant, il est important de considérer la largeur de la bande SPR obtenue ; plus celle-ci est étroite, plus l'appareil est sensible. Une bande étroite signifie que le plasmon est homogène sur la surface, et donc absorbe à une gamme étroite de longueurs d'onde. Ceci démontre donc l'importance d'une épaisseur de métal constante sur toute la surface d'un prisme SPR. Finalement, la nature du métal joue aussi un rôle quant à la largeur de la bande SPR, mais tel que discuté plus haut, l'or représente le meilleur choix.

1.1.3 Instrumentation

Tel que mentionné plus haut, les premiers montages SPR ont vu le jour vers la fin des années 60 dans les laboratoires de Kretschmann⁷ et d'Otto.⁶ Dus à la simplicité des composantes, les montages qui utilisent la réflexion totale interne d'un faisceau lumineux dans un prisme de verre recouvert d'une mince surface métallique sont encore les plus utilisés aujourd'hui, soit celui proposé par Kretschmann.

Un aspect important des montages SPR réside dans l'utilisation de lumière polarisée. En effet, à l'intérieur d'un montage SPR se trouve un polariseur à l'entrée ou à la sortie du prisme. Ce faisant, les polarisations S et P sont sollicitées lors des analyses. Tout d'abord, un faisceau lumineux de polarisation S est dirigé vers la surface d'or. En polarisation S, le champ électrique du faisceau lumineux est parallèle à la surface d'or, et donc ne peut entrer en résonnance avec le plasmon de surface, tel qu'exprimé par l'onde bleue à la figure 8. La lumière est donc entièrement réfléchiée vers le détecteur, et l'intensité lumineuse mesurée correspond à I_0 , qui reste constante tout au long de l'analyse. Ensuite, l'analyse est effectuée en polarisation P (onde démontrée en rouge à la figure 8), car de cette façon le champ électrique du faisceau lumineux est perpendiculaire à la surface de métal, et donc peut entrer en résonnance avec le plasmon. L'intensité I est donc mesurée au détecteur à un temps donné. C'est donc en faisant le rapport I/I_0 , en fonction de la longueur d'onde d'excitation, qu'il est possible de tracer un spectre SPR tel qu'illustré plus loin à la figure 10 A.

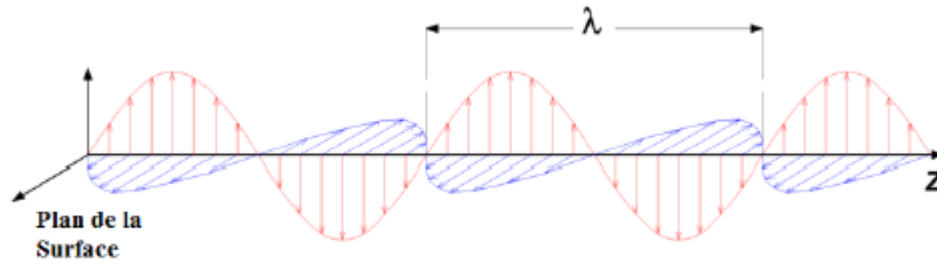


Figure 8. Polarisation de la lumière lors d'une analyse SPR classique. En rouge, la lumière est polarisée P, tandis qu'en bleu elle est polarisée S.²³

En spectroscopie SPR, il existe trois types d'analyse ; l'interrogation des angles, l'interrogation de la longueur d'onde, et l'imagerie SPR par mesure de réflectivité. Pour ce qui est de l'interrogation des angles, il suffit de mesurer le changement d'angle d'incidence SPR à l'aide d'une source monochromatique, tandis qu'en interrogation de la longueur d'onde il suffit de mesurer le changement de la longueur d'onde SPR d'une source lumineuse polychromatique à l'aide d'un angle fixe.

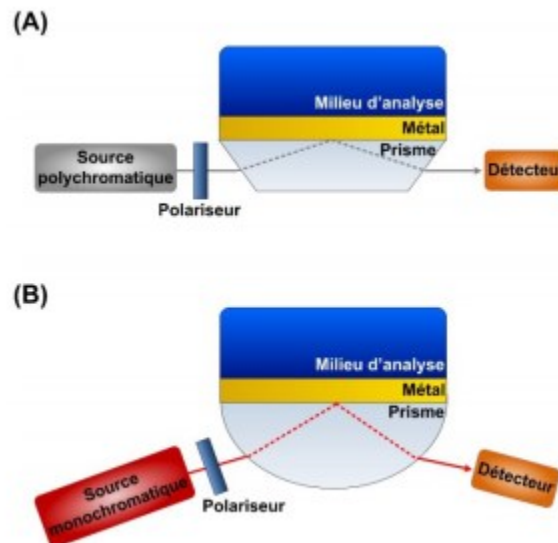


Figure 9. Configuration optique des instruments SPR. (A) : Interrogation de la longueur d'onde, montage à angle fixe. (B) : Interrogation de l'angle, montage à longueur d'onde fixe.²⁴

Un montage à angle fixe (Figure 9 A) offre un appareillage plus compact, étant donné qu'un angle fixe permet un montage à 180° sans avoir à modifier l'angle d'incidence. Un faisceau lumineux d'une source polychromatique est donc projeté vers un prisme, puis réfracté

vers la surface à un angle permettant une RTI. Le faisceau est ensuite réfléchi puis renvoyé vers un détecteur. Dans ce type de montage, il est cependant très important d'utiliser de la lumière collimatée, afin d'avoir un seul angle de propagation. En effet, sachant que la lumière est réfractée différemment dans le prisme en fonction de sa longueur d'onde, ceci est une considération non négligeable. Un seul angle de propagation peut être difficile à obtenir, et donc ceci peut venir élargir la bande et diminuer la résolution des spectres SPR. Pour ce type d'analyse, un spectrophotomètre mesure l'intensité de toutes les longueurs d'onde, et détermine ainsi la longueur d'onde du plasmon. Les appareils exploitant ce type d'analyse sont souvent les appareils utilisés pour les analyses sur le terrain, étant donné leur format compact.

Pour ce qui est d'un montage à longueur d'onde fixe (figure 9 B), un laser ou une source monochromatique est dirigé vers un prisme sphérique ou cylindrique. Un balayage d'angle d'incidence est effectué, à l'aide d'un mécanisme effectuant la rotation du prisme ou des bras articulés supportant la source et le détecteur. Le plasmon est donc excité, et un spectre est bâti, lorsque le laser est réfléchi sous la surface du prisme et redirigé vers un détecteur. Dans ce cas-ci, le détecteur est généralement un tube photomultiplicateur ou une photodiode de silice. Ici, le fait d'avoir un prisme sphérique permet d'avoir toujours un angle d'incidence de 0° par rapport à la normale de l'interface prisme-air, et donc aucune compensation n'est nécessaire concernant la réfraction. Ce type de montage offre donc une sensibilité accrue, mais nécessite par contre un temps d'analyse plus long, en plus d'avoir un niveau de complexité du montage plus élevé, étant donné l'alignement optique complexe.²⁵

Il est vrai qu'un montage à longueur d'onde fixe permet une meilleure sensibilité, et donc permet l'obtention de spectre SPR de haute qualité. Cependant, le temps d'analyse plus court et la miniaturisation d'un montage à angle fixe sont exploités dans le cadre des travaux de ce mémoire. De fait, tel qu'expliqué au chapitre 2, un montage à angle fixe faisant l'interrogation de la longueur d'onde d'excitation est utilisé. Ce montage permet de suivre les variations d'indice de réfraction du milieu d'analyse en mesurant la longueur d'onde SPR (figure 10 A). Les variations de longueurs d'onde, lorsque tracées en fonction du temps (figure 10 B), permettent de faire en temps réel l'étude d'interactions biomoléculaires, ou bien de mesurer l'affinité entre biomolécules.

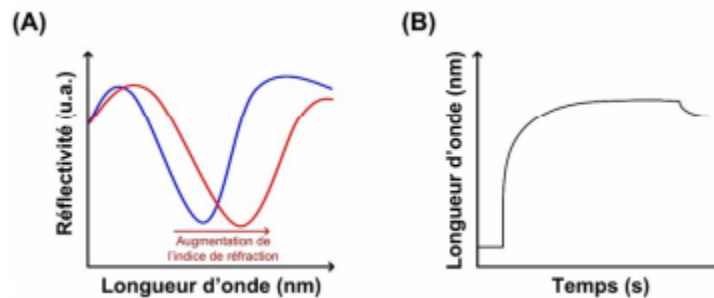


Figure 10. (A) Variation de la bande SPR en fonction d'un changement d'indice de réfraction à la surface du prisme. (B) Variation de la longueur d'onde du plasmon en fonction du temps.²⁴

La sensibilité des appareils SPR à l'indice de réfraction peut s'étendre sur une distance d'environ 200 nm dans le milieu d'analyse à partir de la surface métallique. Cette distance correspond à la diminution du champ électrique perpendiculairement à la surface d'or tel qu'indiqué à la figure 3. Ce 200 nm est donc la zone de sensibilité du capteur, et toute molécule s'adsorbant à la surface de métal à l'intérieur de cette zone peut être quantifiée avec une grande sensibilité (généralement de l'ordre du nM ou pM), ce qui fait de la spectroscopie SPR un outil puissant de biodétection et de quantification.

Pour ce qui est du troisième type d'analyse, soit l'analyse en imagerie SPR, les montages utilisés sont plus souvent à longueur d'onde fixe. Effectivement, les montages d'imagerie SPR utilisent couramment une géométrie à longueur d'onde fixe, effectuant un balayage des angles à l'aide de miroirs rotatifs. Néanmoins, si l'angle d'incidence est balayé au début de chaque analyse, l'acquisition de données en imagerie SPR se fait à angle fixe également. De fait, le balayage est effectué en début d'analyse seulement afin de déterminer l'angle optimal pour l'acquisition des données. L'angle optimal est en fait l'angle à laquelle la variation d'intensité lumineuse en fonction de l'indice de réfraction du milieu d'analyse est la plus importante. Une fois déterminé, c'est donc à cet angle fixe que seront effectuées les analyses. Les mesures prises au détecteur sont donc l'intensité lumineuse en fonction de la position.

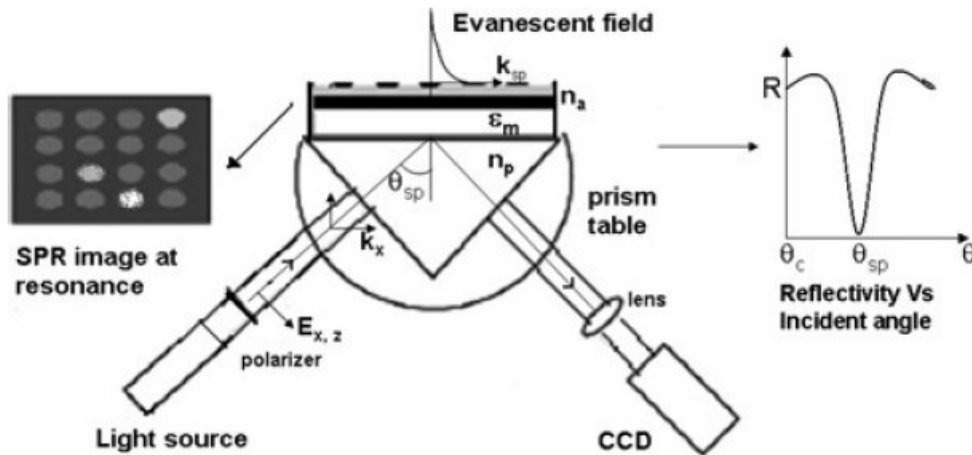


Figure 11. Schéma d'un imageur SPRi, interrogeant l'intensité lumineuse à angle fixe.¹

En imagerie SPR, le détecteur utilisé est une caméra à dispositif à couplage de charge (CCD – *Charge-Coupled device*). En effet, les autres types de détecteurs utilisés en spectroscopie SPR (tubes photomultiplicateur, barrettes de diodes, spectrophotomètre simple) ne permettent pas d'obtenir une image. C'est donc pourquoi les montages d'imagerie SPR font appel aux caméras CCD, qui elles permettent une résolution spatiale supérieure. En effet, les caméras CCD possèdent une surface composée de pixels, qui sont eux-mêmes composés de semi-conducteurs capables de transformer un signal lumineux en signal électrique. Le signal électrique est ensuite envoyé à un ordinateur qui lui recrée l'image enregistrée. Plus la caméra CCD possède de pixels à sa surface, plus la résolution de l'image est élevée.

Il existe plusieurs autres façons d'effectuer de l'imagerie SPR, notamment en faisant le suivi de la bande de la réflectivité en fonction de l'angle.²⁶ Ce type d'analyse nécessite essentiellement le même montage que décrit plus haut, mais cette fois fait varier l'angle d'incidence en suivant le minimum de réflectivité. Cependant, dans le cadre de ce mémoire, le montage d'imagerie SPR utilisé balaye en continu une gamme d'angles d'incidence, et le minimum de la bande, soit le minimum de réflectivité, est suivi. Tel que décrit plus haut, ce genre d'analyse offre une meilleure résolution, au détriment d'un temps d'analyse plus long.

1.1.4 Applications

Tel que mentionné plus haut, la SPR bénéficie d'une très grande sensibilité, faisant de celle-ci une technique de choix pour la biodétection, mais aussi pour la détection d'analytes en faible concentration dans des matrices complexes. En effet, la spectroscopie SPR est un outil puissant se démarquant pour l'étude d'interactions biomoléculaires, de mesure d'affinité entre biomolécules, de biodétection quantitative ou même d'études cinétiques pour un système donné.

À titre d'exemple, en 2003 la professeure Sharon A. Doyle, de l'Université d'Oxford utilise la SPR pour la sélection, la caractérisation, et l'étude de l'affinité de plusieurs aptamers, dans le but de développer de nouveaux types de biocapteur.²⁷ Dans un même ordre d'idée, la SPR est utilisée pour l'étude d'anticorps^{28, 29}, parfois même à l'aide de criblage à haut débit permettant l'étude de plusieurs systèmes en peu de temps.³⁰ Toujours dans le domaine de l'interaction biomoléculaire et de la biodétection, la SPR est souvent utilisée dans le processus de découverte de nouveaux médicaments ou de nouvelles molécules thérapeutiques. En effet, l'identification de biomolécule cible, le criblage, et l'optimisation d'analytes potentiels sont des étapes cruciales entourant les premiers pas du processus de découverte de nouveaux médicaments. Non seulement la SPR permet de franchir ces étapes, elle permet aussi d'obtenir des informations sur les interactions cible-analyte d'un système donné, et ce de façon rapide et efficace, accélérant le processus de découverte de médicaments. Dans un contexte où la compétition industrielle est forte, telle qu'elle l'est dans l'industrie pharmaceutique, la SPR représente une technique puissante notamment grâce aux avantages qu'elle offre, soit l'analyse sans marquage, la capacité d'analyses en temps réel, et la possibilité d'études cinétiques d'un système cible-analyte. C'est pourquoi, depuis maintenant plus de 20 ans, la SPR est largement utilisée dans le processus de découverte de nouveaux médicaments.³¹⁻³⁶

De plus, le domaine de l'analyse alimentaire trouve son intérêt auprès de la technologie SPR. En effet, la SPR est souvent utilisée afin de détecter la présence de diverses molécules toxiques dans l'industrie agroalimentaire, par exemple les herbicides, les pesticides, les restes de médicaments vétérinaires dans certaines viandes, les agents infectieux ou pathogène, additifs alimentaires, etc.^{37, 38}

Du côté de l'imagerie SPR, celle-ci offre l'immense avantage de pouvoir analyser un nombre considérable d'échantillons en peu de temps. Une approche souvent utilisée consiste à fonctionnaliser la surface d'une sonde SPRi avec plusieurs biocapteurs différents, et de détecter les interactions rencontrées lors du passage d'un échantillon, le tout simultanément.³⁹⁻⁴¹ L'imagerie SPR peut aussi être utilisée afin de faire l'imagerie de structure physique, telle que l'a fait Edgar D. Goluch, de l'Université de Northeastern, avec l'évaluation de l'adhésion de biofilms sur différentes surfaces.² Dans le même ordre d'idée, récemment l'imagerie SPR, couplée à la spectrométrie de masse, est utilisée au sein des groupes de recherche des professeurs Jean-François Masson et Pierre Chaurand de l'Université de Montréal, afin d'obtenir des images quantitatives, qualitatives et régiosélectives de coupes tissulaires minces³. D'ailleurs, les travaux de ce mémoire sont directement basés sur cette approche.

1.2 Biodétection en SPR

1.2.1 Les biocapteurs

Tel que mentionné dans la section 1, la biodétection utilise fréquemment des biocapteurs. En effet, un biocapteur est, par définition, un outil analytique permettant de traduire un signal biologique en signal mesurable (signal optique, thermique ou électrique par exemple), par le biais de réactions biochimiques spécifiques entre une ou plusieurs composantes biologiques.⁴² Autrement dit, un biocapteur permet d'attribuer un signal mesurable à la présence d'une biomolécule spécifique, c'est donc pourquoi il est possible de parler de biodétection. Parmi ces composantes biologiques, souvent sont utilisés les protéines, les anticorps, les enzymes, les assemblages d'acides nucléiques (ADN ou ARN), les chaînes peptidiques, les tissus, les cellules ou même les organelles. Toutes ces composantes biologiques ont la capacité, par le biais d'interactions non covalentes, de se lier spécifiquement et de manière relativement robuste à diverses biomolécules. Le choix du biocapteur se fait donc en fonction de la biomolécule cible. Plusieurs principes de fonctionnement existent donc, le plus populaire étant le principe de fonctionnement du glucomètre, depuis longtemps commercialisé, et décrit un peu plus haut de ce présent chapitre. Dans le contexte de ce mémoire, le biocapteur d'intérêt mesure le changement de signal optique suite à la reconnaissance spécifique d'un analyte par un anticorps greffé à la surface d'une sonde SPR.

1.2.2 Chimie de surface

Parmi les étapes de fabrication d'une sonde SPR se trouve la fonctionnalisation de la surface d'or. La fonctionnalisation de la surface d'or représente l'étape cruciale à la formation de biocapteur SPR, car c'est elle qui déterminera la robustesse et la spécificité de la sonde. Une sonde SPR idéale possèdera une fonctionnalisation permettant la détection d'analyte en condition dure, en éliminant tout signal provenant d'analytes non spécifiques. De fait, le signal non spécifique en SPR représente un défi considérable, et donc mérite d'être adressé convenablement.

Étant donné que la SPR repose sur la mesure de l'indice de réfraction, tout analyte, cible ou non, se posant sur le capteur, engendrera un changement de l'indice de réfraction, et donc un signal mesuré. Afin de pouvoir attribuer avec conviction un signal à un analyte cible, il est primordial de réduire autant que possible tout signal provenant de l'adsorption d'autres molécules. Sur une sonde SPR, pour tout signal provenant d'ailleurs, on parle d'adsorption non spécifique. Puisque les analyses SPR sont souvent effectuées dans des matrices complexes (fluides biologiques, eau de sol, tissu, etc.), par exemple dans le cadre d'analyses cliniques, ou encore des travaux présentés dans ce mémoire, l'adsorption non spécifique représente une problématique non négligeable. De fait, toutes biomolécules présentes dans une matrice biologique (urine, plasma sanguin, sérum, tissu, etc.) sont susceptibles de s'adsorber non spécifiquement à la surface d'une sonde SPR, engendrant un signal indiscernable du signal engendré par l'analyte cible.

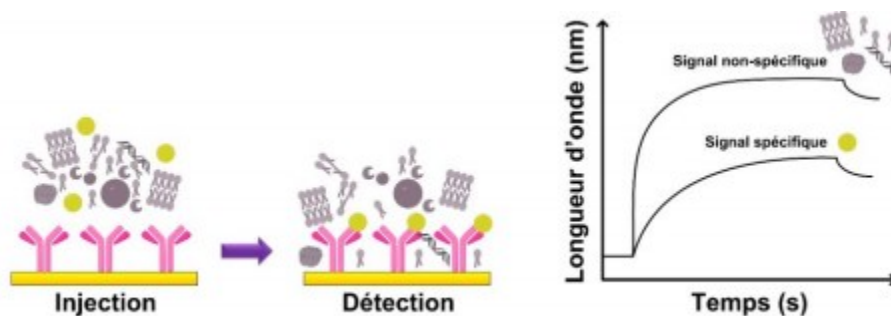


Figure 12. Illustration du phénomène d'absorption non spécifique sur une sonde SPR, lors de l'injection d'un analyte en matrice complexe.²⁴

Sur la figure 12, il est possible de voir de façon distincte les signaux attribués à l'adsorption spécifique et non spécifique. Par contre, lors d'une analyse en SPR, seulement un signal est mesuré qui correspondrait à la somme des deux signaux illustrés, étant donné qu'un seul changement d'indice de réfraction est mesuré. De plus, il est possible de voir à la figure 12 que l'apport du signal non spécifique peut être plus élevé que le signal spécifique, ce qui est souvent le cas dans des matrices où l'analyte cible est dissous dans une quantité importante de biomolécules différentes.

Afin d'éviter le phénomène d'adsorption non spécifique, et de seulement permettre à l'analyte cible de s'adsorber à la surface, divers types de chimies de surface sont développés. Il est connu qu'une surface fonctionnalisée adéquatement peut permettre une réduction de l'adsorption non spécifique sans engendrer une réduction d'adsorption spécifique.⁴³ Le but est de minimiser les interactions entre les biomolécules de la matrice et les biocapteurs à la surface de la sonde SPR, afin d'avoir un signal attribuable à l'analyte cible, sans avoir à concentrer celui-ci.

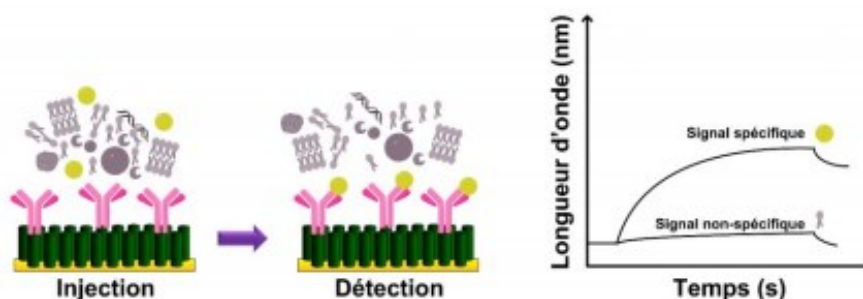


Figure 13. Illustration du phénomène d'adsorption non spécifique sur une sonde SPR fonctionnalisée par une monocouche auto-assemblée, lors de l'injection d'un analyte en matrice complexe.²⁴

Il est possible de remarquer à la figure 13 que, contrairement à la figure 12, le signal non spécifique est moins important que le signal spécifique. Ici, la surface vient jouer un rôle clé dans l'apport des deux types d'adsorptions pour le signal total mesuré. Une surface fonctionnalisée adéquatement réduira l'apport du signal non-spécifique et maximisera l'apport du signal spécifique. Le développement de ce genre de surface, souvent des monocouches auto-assemblées, est bien documenté dans la littérature, et il est important d'en avoir une bonne compréhension. En effet, bien visualiser les mécanismes chimiques de fonctionnalisation d'une

surface permet le développement de surface répondant aux besoins d'analyses en matrice complexe.

1.2.2.1 Monocouche auto-assemblée

Tout d'abord, les monocouches auto-assemblées (SAM – *Self-Assembled Monolayers*) sont des couches de molécules se formant de façon spontanée par adsorption sur diverses surfaces. Celles-ci sont dites monocouches, car elles ont l'épaisseur d'une seule molécule, et ne forment pas de bicouche ou de couches multiples. Les molécules s'arrangent d'elle-même à la surface, lors d'un processus s'étalant sur plusieurs heures, de façon à maximiser leur interaction et ainsi diminuer l'énergie du système. Sur une sonde SPR, la monocouche a deux fonctions cruciales à l'obtention d'un biocapteur efficace ; elle doit permettre l'ancrage de récepteur biomoléculaire, en plus de réduire le plus possible l'adsorption non spécifique.

Premièrement, il est primordial que la monocouche puisse non seulement permettre l'ancrage de récepteur spécifique, mais aussi elle doit favoriser l'activité de celui-ci. De fait, un récepteur biomoléculaire spécifique, tel qu'un anticorps, doit pouvoir se greffer sur la monocouche, afin de permettre à la sonde d'effectuer la biodétection d'analyte. D'autre part, il est connu que les biomolécules, comme les anticorps, peuvent voir leur activité significativement diminuée lorsqu'en milieu défavorable, par exemple directement sur une surface d'or dans le cas d'une sonde SPR, ou bien même sur une monocouche inadéquate.⁴⁴ Une telle monocouche engendrerait une perte d'efficacité considérable de l'anticorps, et donc par le fait même une perte d'efficacité de la sonde SPR. Deuxièmement, tel que mentionné plus haut, la monocouche protège la sonde SPR de l'adsorption non spécifique. Une monocouche optimale permet donc la biodétection d'analyte présent en faible concentration dans une matrice complexe, étant donné l'efficacité du récepteur biomoléculaire et l'absence d'adsorption non spécifique. Dans le cas d'une sonde SPR recouverte d'or, les monocouches les plus utilisées et les plus documentées dans la littérature sont les monocouches formées à base d'organosulfurés. En effet, l'interaction thiol-or permet un lien quasi covalent entre l'or et l'atome de soufre. Cette interaction sera exploitée dans le cadre des travaux de ce mémoire.

De fait, il est connu que les composés organosulfurés peuvent créer des liens de coordination très forts avec plusieurs métaux de transition, notamment l'argent, le cuivre, le

platine, le mercure, et le fer. Toutefois, les liens les plus étudiés et documentés dans la littérature sont les liens thiol-or.⁴⁵ Des études cinétiques au sujet de l'adsorption d'alcanethiols sur des surfaces d'or ont permis de démontrer que l'adsorption se produit en deux étapes distinctes.

La première étape se produit de façon spontanée, sur une courte période de temps, de quelques minutes à quelques heures, en fonction de la concentration d'alcanethiols en solution. Typiquement, la concentration utilisée est de 1 mM, ce qui permet à la première étape de s'étaler sur quelques minutes seulement. Lors de cette étape, les molécules s'adsorbent de manière désorganisée sur la surface d'or, suivant un modèle cinétique de Langmuir. En effet, l'adsorption est très rapide au début, et ralentie au fur et à mesure que le nombre de sites disponibles sur la surface d'or diminue. Lors de cette étape, environ 80-90% des molécules s'adsorbent à la surface.

Pour ce qui est de la deuxième étape, celle-ci s'étale sur plusieurs heures. Effectivement, c'est lors de cette étape que les molécules adsorbées à la surface s'organisent entre elles, de façon à obtenir une structure cristalline en deux dimensions. Voulant diminuer l'énergie du système, les molécules adsorbées à la surface s'ordonnent de façon à maximiser leurs interactions moléculaires, majoritairement des interactions de van der Waals. Évidemment, plus les chaînes alkyles sont longues, plus il y a d'interaction entre elles, et donc plus la structure cristalline est compacte et se forme rapidement. Inversement, lorsque les chaînes alkyles sont plus courtes, ou présentent des structures moléculaires irrégulières, les interactions de van der Waals sont plus limitées, ce qui affaiblit la structure cristalline de la monocouche. Dans de tels cas, celle-ci se présente plus sous forme d'agrégats à la surface.⁴⁶ Cependant, le recouvrement de la surface par ce genre de molécules est assez significatif pour que les propriétés de surface dépendent de la nature celles-ci.

Tout dépendamment de la matrice utilisée lors d'une analyse SPR, la nature même de la monocouche a une énorme influence sur l'adsorption non spécifique. De fait, une monocouche développée pour prévenir l'adsorption non spécifique en sérum sanguin peut très bien être non efficace en lysat cellulaire, biopsie solide, ou tout autre fluide biologique.⁴⁷ Depuis maintenant quelques années, le groupe de recherche du professeur Jean-François Masson travaille à développer des monocouches peptidiques auto-assemblées capables de réduire considérablement l'adsorption non spécifique pour des analyses de biodétection dans différentes

matrices biologiques. En effet, il a été démontré que des monocouches peptidiques, de différentes natures tout dépendamment de la matrice biologique utilisée, offrent une diminution non négligeable de l'adsorption non-spécifique.^{24, 43, 47} Les monocouches peptidiques offrent un environnement hydraté et de nature biologique à la surface de la sonde SPR, procurant un bon ancrage aux biorécepteurs et optimisant leur activité biologique. La polarité, l'hydrophobicité, la longueur des peptides ou bien la présence de groupements aromatiques ou de charges sur les peptides, sont des critères pouvant influencer l'efficacité d'une monocouche peptidique auto-assemblée.

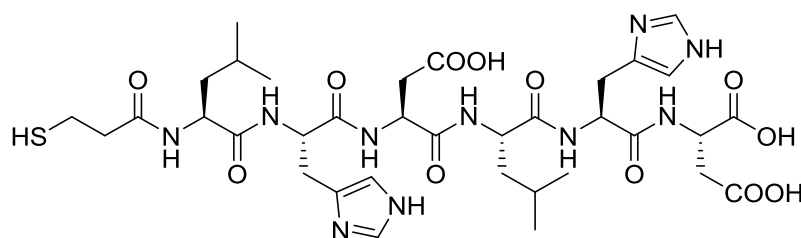


Figure 14. 3-MPA-[(Leu)(His)(Asp)]₂-OH, ou LHDLDH ; Peptide développé dans les laboratoires du professeur Masson étant efficace à réduire l'adsorption non spécifique du sérum.⁴⁸

Tel qu'observé à la figure 14, le peptide illustré est composé de 6 acides aminés, soient deux leucines, deux histidines, et deux acides aspartiques. Aussi, en bout de chaîne, le peptide possède un groupement thiol (acid 3-mercaptopropionique, ou 3-MPA) permettant ainsi son greffage à une surface d'or. De l'autre côté de la chaîne, le peptide se termine par un groupement carboxyle, permettant l'ancrage de biorécepteurs. Une monocouche composée d'un tel peptide possède donc les avantages préalablement énumérés pour effectuer de la biodétection en SPR, et donc est utilisé dans le cadre des travaux de ce mémoire.

Pour ce qui est de l'ancrage d'un biorécepteur à une monocouche auto-assemblée, la chimie la plus utilisée exploite le EDC/NHS. Cette chimie permet la formation d'un lien amide entre une amine primaire et un groupement fonctionnel acide carboxylique, utilisant le N-Ethyl-N'-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide (EDC) et le N-hydroxysuccinimide (NHS).⁴⁹ Dans le cadre des travaux de ce mémoire, le biorécepteur utilisé est l'anticorps, et c'est pourquoi la chimie EDC/NHS peut très bien être utilisée. Effectivement, les anticorps sont des protéines composées de peptides, et la surface extérieure de leur structure tertiaire présente souvent des

lysines. La lysine est un acide aminé possédant comme groupement latéral une chaîne alkyle de quatre carbones se terminant par une amine primaire, et cette amine est chargée positivement à pH physiologique. C'est donc pourquoi la protéine se structure de façon à diriger le plus possible vers l'extérieur de la structure tertiaire ces groupements amines.

Le processus de couplage entre l'anticorps et la monocouche se fait en 2 étapes. Premièrement, le groupement carboxyle en bout de chaîne de la monocouche réagit avec l'EDC, et ensuite avec le NHS pour donner un ester stable; intermédiaire permettant une conjugaison efficace avec une amine primaire. La deuxième étape, consiste évidemment en la réaction entre l'amine de l'anticorps et l'ester de l'intermédiaire formé.

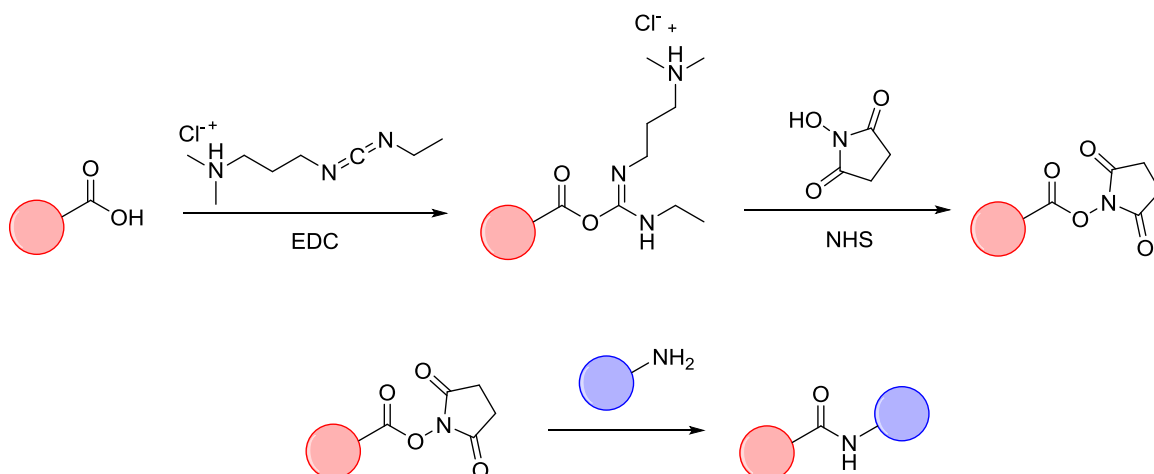


Figure 15. Réaction illustrant le couplage de la monocouche peptidique avec un anticorps. Les boules rouges représentent la chaîne peptidique, tandis que les boules bleues représentent l'anticorps.

De la même façon que les monocouches auto-assemblées, l'ancrage des anticorps se fait selon un modèle cinétique de Langmuir. Cependant, les anticorps sont de grosses protéines, et donc iront encombrer de façon considérable la surface. Ceci veut donc dire que plusieurs sites d'ancrage resteront dans l'incapacité de réagir, étant situés dans des endroits trop encombrés sous les anticorps déjà ancrés. Il est donc nécessaire de désactiver ses sites afin d'éviter tout couplage indésirable avec des biomolécules présentes dans la matrice d'intérêts. L'éthanolamine est couramment utilisée à cette fin.

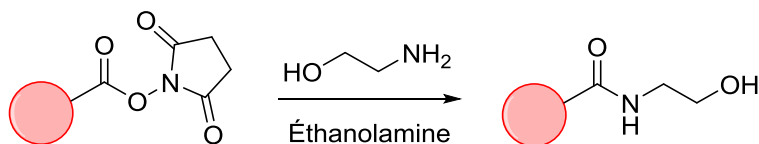


Figure 16. Désactivation d'un site d'ancrage par une réaction avec l'éthanolamine.

Ici, l'éthanolamine est présente en excès important, et donc tous les sites sont considérés comme désactivés après cette étape. Suite à ces étapes permettant la fonctionnalisation de la sonde SPR, celle-ci est prête à la biodétection. En effet, la chimie de surface effectuée sur la sonde permet d'obtenir un biocapteur SPR capable de détecter spécifiquement un analyte cible dans une matrice biologique complexe.

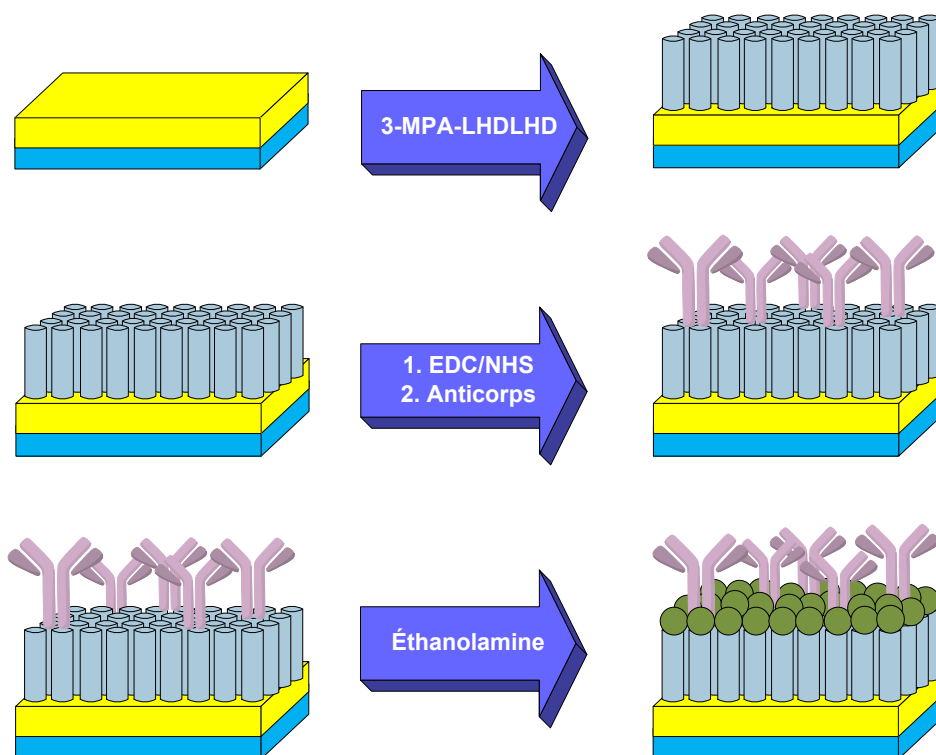


Figure 17. Différentes étapes de fonctionnalisation d'une sonde SPR par chimie de surface. À la fin est obtenu un biocapteur SPR, spécifique à l'antigène relatif à l'anticorps ancré.

1.2.3 Quantification du matériel par SPR

Tel que mentionné plus haut, une sonde SPR peut non seulement faire la biodétection, mais peut aussi faire la quantification de biomolécule cible. En effet, lorsqu'un analyte s'adsorbe spécifiquement à la surface de la sonde, un changement d'indice de réfraction est mesuré par celle-ci, se traduisant par une variation de la bande SPR. L'amplitude de variation de cette bande est directement proportionnelle à la quantité de matériel adsorbé à la surface. Avec une sonde imperméable à l'adsorption non spécifique, le matériel adsorbé serait spécifiquement l'analyte cible. Cependant, la mesure obtenue reste strictement empirique, et donc il est convenu de mesurer la variation de la bande SPR suite à l'injection de solutions ayant des concentrations connues d'analyte. Ce faisant, il est possible d'obtenir une courbe d'étalonnage linéaire permettant de quantifier des échantillons à concentration inconnus. Encore une fois, la cinétique d'adsorption de l'analyte suit le modèle de Langmuir. La mesure est donc le changement de la bande SPR depuis la ligne de base avant l'injection, jusqu'à l'obtention d'un plateau. Néanmoins, une courbe d'étalonnage linéaire peut être obtenue seulement pour une petite gamme de concentrations. De fait, le signal, lorsqu'en fonction de la concentration, suit lui aussi un isotherme de Langmuir. Donc, à un certain point, le signal finira par plafonner malgré une augmentation constante de la concentration de l'analyte. Lorsqu'un montage SPR à angle fixe est utilisé, la relation mettant en fonction la concentration et le signal SPR est la suivante :

$$\lambda_{SPR} = \left(\frac{[analyte]K_A\lambda_{max}}{[analyte]K_A + 1} \right) \quad (7)$$

Ici, λ_{SPR} représente la variation de la longueur d'onde SPR suite à l'injection de l'échantillon (de la ligne de base jusqu'à l'obtention d'un plateau), $[analyte]$ représente la concentration de l'analyte, K_A représente la constante d'association entre l'analyte et le biorécepteur à la surface de la sonde, et λ_{max} représente la longueur à laquelle le plateau est atteint suite à l'injection de l'échantillon.

1.3 Techniques d'imagerie de coupes tissulaires

Les techniques permettant l'imagerie de coupes tissulaires ou de minces films biologiques sont souvent des incontournables dans le domaine de la biodétection. En effet,

l'imagerie fournit beaucoup d'information concernant l'agencement spatial de biomolécules au sein de tissus biologiques, permettant le suivi ou même le diagnostic de certaines pathologies.⁵⁰ Sachant que le diagnostic de plusieurs troubles physiologiques nécessite de l'information sur la concentration locale de certains biomarqueurs spécifiques au sein d'un tissu, les techniques d'imagerie deviennent des outils essentiels pour les pathologistes. Aujourd'hui, parmi les techniques les plus couramment utilisées se trouvent l'immunohistochimie et l'imagerie par spectrométrie de masse MALDI. Il est important de brièvement comprendre ces techniques, leurs avantages ainsi que leurs limitations, afin de bien situer les travaux effectués dans le cadre de ce mémoire. Cette section a donc pour but d'aborder en surface ces deux techniques d'imagerie moderne, pour motiver les objectifs de recherches énoncés dans ce mémoire.

1.3.1 Imagerie par immunohistochimie

L'immunohistochimie est une technique utilisée afin de mesurer la présence, l'accumulation ou la diminution de la concentration locale de biomolécules cibles au sein de tissus biologiques. Elle utilise les interactions anticorps/antigènes afin de situer localement ces dits antigènes au sein des échantillons biologiques. Les antigènes cibles sont souvent des biomolécules présentes dans les tissus analysés pouvant aller de courtes chaînes peptidique jusqu'à des protéines complètes ou des agents infectieux. Les analyses en immunohistochimie se divisent généralement en 2 étapes : la préparation de l'échantillon et l'analyse de celui-ci. La préparation de l'échantillon consiste à fixer la coupe tissulaire sur un support physique (souvent une lamelle de verre), pour ensuite le traiter à l'aide de l'anticorps spécifique à l'analyte cible. Un système de détection (réaction colorée ou fluorescente de l'anticorps en présence de l'antigène) permet ensuite de révéler les endroits où l'anticorps s'est lié, donc les endroits où se trouve l'antigène au sein du tissu. Les lamelles sont ensuite analysées par microscopie ou spectrophotométrie.

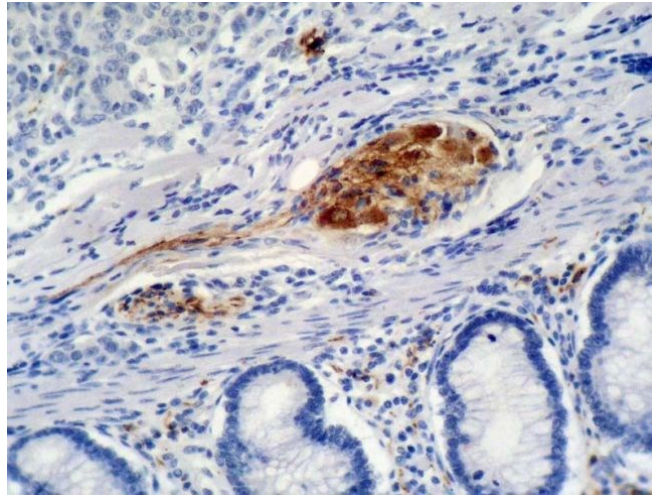


Figure 18. Détection de la protéine *p21* au sein d'un poumon humain cancéreux. La coloration brune révèle l'emplacement de la protéine.⁵¹

D'entrée de jeux, l'immunohistochimie semble être en soit une technique de biodétection relativement simple. Cependant, le niveau d'information que procure cette technique peut être directement proportionnel à l'expérience de l'analyste qui prépare l'échantillon et à l'expérience du pathologiste qui interprète les résultats.⁵² Donc, malgré la simplicité de la méthode, celle-ci nécessite une rigueur soutenue, et donne parfois des résultats subjectifs. En effet, d'une analyse à l'autre, beaucoup de facteurs peuvent influencer les résultats, tels que le choix de l'anticorps par exemple, alors que la cible reste la même. L'analyse de tissu par immunohistochimie nécessite donc la présence de chercheurs rigoureux et qualifiés, ce qui rend difficile le diagnostic en milieu clinique.

De plus, un des désavantages majeurs de l'immunohistochimie réside dans le fait que cette technique n'est que difficilement quantitative. Effectivement, étant donné les nombreux facteurs pouvant varier autour d'une même analyse, la quantification de protéine par immunohistochimie devient très limitée. Bien que des expériences quantitatives ont déjà été réalisées,⁵³ on parle plus souvent de résultats semi-quantitatifs. L'immunohistochimie représente donc une technique efficace afin de révéler localement la présence d'analyte cible au sein de coupe tissulaire, mais comporte de nombreux désavantages, tels que la nécessité de marquage de l'analyte (qui représente un risque d'introduction d'artéfact), la nécessité d'une main-d'œuvre qualifiée, et l'obtention de résultats subjectifs et semi-quantitatifs.

1.3.2 Imagerie par spectrométrie de masse (MALDI-iMS)

La désorption-ionisation laser assistée par matrice (MALDI) est une technique importante pour l'analyse et l'identification de biomolécules.⁵⁴⁻⁵⁸ De nos jours, le MALDI est principalement utilisé en mode imagerie MS (IMS) qui consiste en l'analyse d'une surface à chacune des coordonnées prédéfinies par l'utilisateur.^{59, 60} Il est ensuite possible de produire une image d'ions en transposant l'intensité d'un ion d'intérêt en fonction des coordonnées de chaque spectre MS. L'imagerie MALDI est principalement utilisée pour analyser de coupes tissulaires minces afin de visualiser la distribution spatiale de différentes classes de biomolécules telles que les lipides, les peptides, ou les protéines. De façon générale, une analyse MALDI passe par les étapes suivantes ; l'échantillon est monté sur une surface conductrice, sur laquelle est ensuite déposée une matrice de façon uniforme. Une matrice MALDI-IMS est une molécule de faible poids moléculaire ayant la capacité d'absorber la longueur d'onde du laser utilisé, de co-crystalliser avec l'analyte d'intérêt et d'avoir un groupement fonctionnel capable d'effectuer l'échange d'un proton. De là, l'échantillon est introduit dans l'appareil. Une fois dans le spectromètre de masse, un laser UV (généralement de 337, 349 ou 355 nm) irradie l'échantillon à chacune des coordonnées. Ceci provoque la désorption par la production d'un point de chaleur ainsi que l'ionisation locale du contenu moléculaire par échange de proton, pour ensuite permettre la détection de ces ions selon leur ratio masse sur charge (m/z). Il est donc possible d'obtenir une image d'ions démontrant l'intensité de chacun des m/z en fonction de leur distribution dans la coupe tissulaire. Ce faisant, il a été démontré que la MALDI-IMS permet de mesurer de façon locale la présence ou l'absence de biomolécules telles que les protéines, les lipides ou les métabolites en fonction de l'histologie sous-jacente.^{61, 62}

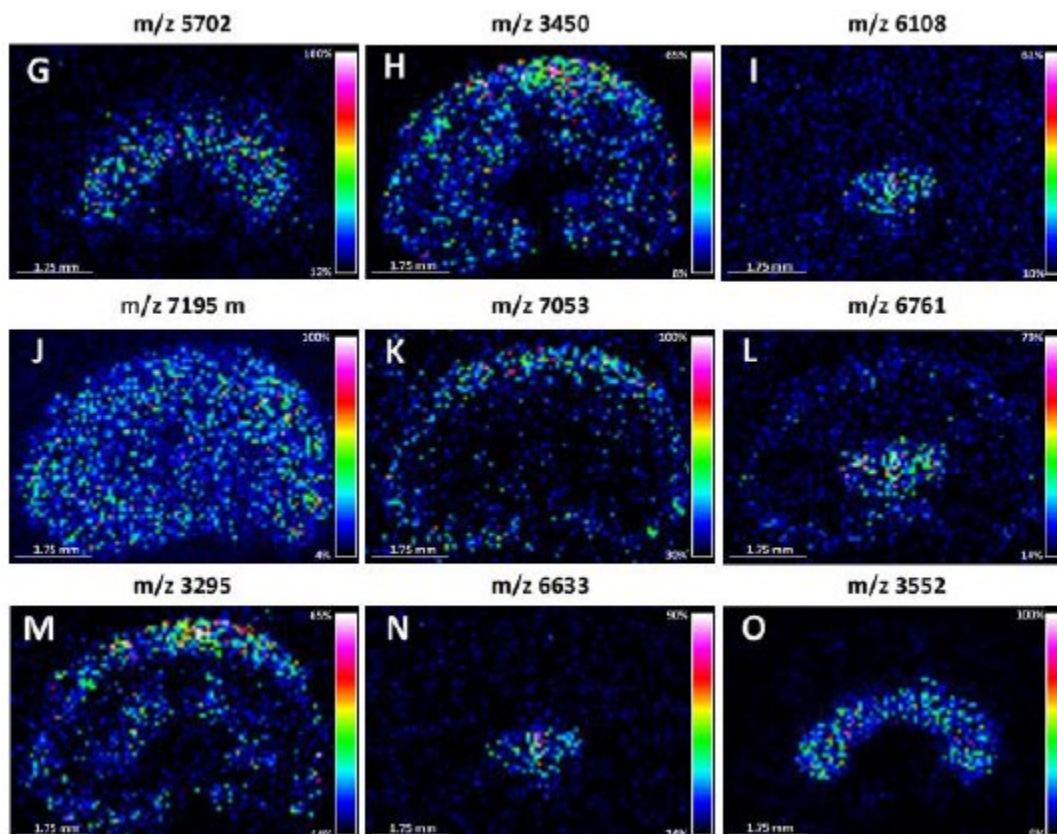


Figure 19. Images MALDI d'une coupe d'un rein de souris d'une épaisseur de 20 μm . Chaque image représente l'intensité d'un ratio m/z différent, selon leur emplacement dans le tissu.³

Ici, la figure 19 démontre la distribution spatiale et l'abondance relative de plusieurs protéines à partir d'une seule coupe tissulaire mince. L'imagerie par spectrométrie de masse MALDI représente donc une puissante technologie qualitative, permettant d'obtenir la composition biomoléculaire ainsi que la distribution de celles-ci dans une section tissulaire. Par contre, malgré l'impressionnante puissance de cette technique, le degré de complexité entourant l'obtention d'analyses quantitatives et régiosélectives reste élevé. En effet, les analyses dites quantitatives en MALDI-IMS sont technologiquement très complexes, et souvent l'absence d'étalon durant les analyses rend très difficile l'obtention d'une quantification fiable.⁶³ Alors, une quantification absolue reste un défi considérable dans le domaine de l'imagerie, et donc le besoin d'une méthode permettant l'obtention d'images quantitatives et qualitatives avec une résolution spatiale surgit.

1.4 Objectif de recherche

Dans ce mémoire, l'objectif principal poursuivi est de développer une méthode reproductible d'imagerie SPR permettant d'obtenir des images quantitatives et régiosélectives de protéines cibles contenues dans de minces coupes biologiques. Pour ce faire, la chimie de surface est utilisée afin de fonctionnaliser adéquatement les surfaces de sonde SPRi, afin de les rendre exclusives aux différentes biomolécules cibles, permettant le moins d'adsorption non spécifique possible. Un imageur SPR commercial sera modifié et adapté afin de permettre des mesures d'imagerie en trois dimensions de minces coupes biologiques, sans toutefois nuire à l'activité des anticorps ancrés à la surface de la sonde SPRi. De plus, l'optimisation du transfert de biomatériau partant du tissu vers la surface de la sonde SPRi devra être effectuée. Le grand défi à cette étape-ci sera d'obtenir un transfert minimisant la diffusion latérale, et favorisant l'adsorption spécifique sans encore une fois nuire à l'activité de l'anticorps. Ultiment, un couplage devra être effectué avec l'imagerie par spectrométrie de masse par désorption-ionisation laser assistée par matrice (MALDI-IMS), permettant la validation, et l'identification hors de tout doute du biomatériau adsorbé à la surface. Un couplage de ces deux méthodes (SPRi et MALDI-IMS) permettrait d'approfondir l'étude du transfert biologique et de l'adsorption autant spécifique que non spécifique, en plus d'obtenir des images quantitatives, qualitatives, et régiosélectives de coupes tissulaires.

Chapitre 2 Partie expérimentale

2.1 Préparation des échantillons

2.1.1 Immobilisation de protéine cible sur lamelles

Une dilution de protéine cible est effectuée jusqu'à la concentration voulue, à partir d'une solution mère, dans une solution saline tamponnée au phosphate. Les concentrations diffèrent d'une expérience à l'autre, entre 10 nM et 5000 nM. Une goutte de 25 µL est ensuite prélevée de la dilution obtenue, et déposée délicatement sur une lamelle de microscope en borosilicate de 9 mm par 9 mm. La lamelle est mise de côté, à température de la pièce, durant une heure, le temps que la goutte s'assèche. Une fois sèche, les lamelles sont prêtes pour l'analyse en SPRi.

2.1.2 Préparation des homogénats de foie de souris

Le protocole afin d'obtenir les homogénats de foie de souris a été adapté à partir de la méthode de Groseclose et Castellino développée en 2013.⁶⁴

Premièrement, 2 à 3 foies de souris congelés sont coupés en morceau à l'aide d'une lame de rasoir. La mixture obtenue est transvidée dans un vial de plastique de type Falcon 15 mL, et celui-ci est placé dans de l'eau glacée pendant 5 minutes afin de complètement décongeler les plus gros morceaux de foie restant. Une dizaine de petites billes d'aciers, préalablement lavées à l'isopropanol 70% sont introduites dans le mélange. Le mélange est agité à l'aide d'un vortex, pendant 1 minute, et est ensuite réintroduit dans l'eau glacée. Cette procédure est répétée jusqu'à l'obtention d'une mixture homogène et sans grumeaux. Les billes sont ensuite retirées à l'aide d'un aimant, de façon délicate afin de limiter les pertes d'homogénat. Finalement, le vial est centrifugé, à 1500 RPM pendant 30 secondes, afin de rassembler l'homogénat dans le fond du vial. Ce dernier est adéquatement identifié, et entreposé à -80 °C jusqu'à son utilisation.

Ensuite, un moule négatif a été préparé à partir d'un vial de type Falcon 15 mL. Le vial a d'abord été coupé environ à la graduation de 12 mL, de façon à conserver le côté avec le bouchon. Le tube obtenu, d'un diamètre de 1 cm, se voit verser un mélange de polymère

(polyvinyle alcool et polyéthylène glycol). Une tige de métal d'un diamètre de 5 mm est alors introduite dans le mélange de polymère, en plein centre du tube. Le tube est ensuite refroidi à -25 °C pendant une heure, afin de faire durcir le polymère. Il est impératif lors de cette étape que la tige de métal reste bien droite, afin de bien former le moule. Pendant ce temps, L'homogénat de foie préalablement préparé est décongelé dans un bain d'eau glacée. La tige est par la suite délicatement retirée du tube, laissant vide l'intérieur de celui-ci. L'homogénat de foie est alors finement introduit dans le tube de polymère à l'aide d'une pipette Pasteur, de façon à éviter toute bulle dans le mélange. Un volume d'environ 2 mL d'homogénat est introduit dans la cavité. Le tout est alors congelé à -80 °C pour une période d'au moins 12 heures.

Un deuxième homogénat de foie, en plus d'un moule négatif, sont préparés de la même façon, cependant cette fois-ci l'homogénat de foie est dopé avec des anticorps humains de type Immunoglobuline Globuline (IgG). De fait, juste avant d'introduire l'homogénat de foie dans le tube de polymère congelé, une solution d'IgG y est ajoutée de façon à obtenir une concentration finale d'environ 1000 nM. L'homogénat est ensuite mélangé au vortex, afin d'assurer l'homogénéité des anticorps, et recentrifugé pendant 30 secondes à 1500 RPM. L'homogénat est introduit dans le tube de polymère, et placé à -80 °C à pendant un minimum de 12 heures. Il est important d'effectuer ces dernières étapes rapidement, et le plus possible en dessous des 4 °C, afin d'éviter que les enzymes présentes dans l'homogénat de foie dégradent l'anticorps ajouté.

2.1.3 Préparation des coupes d'homogénats de foie de souris

Les coupes d'homogénats ont été effectuées avec un cryostat Leica CM3050 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Allemagne), avec une température d'enceinte réglée à -25 °C et une température de coupe de -15 °C. Une coupe d'homogénat a été montée sur une lamelle de microscope de borosilicate de 9 mm par 9 mm.

La première étape consiste à réchauffer l'homogénat à l'intérieur de l'enceinte du cryostat. L'homogénat prend alors 15 min pour passer de -80 °C à -25 °C, température qui facilite les coupes. Le vial de type Falcon entourant le polymère et l'homogénat est ensuite enlevé à l'aide d'un scalpel, et l'homogénat est fixé sur une tête de coupe. Celui-ci est ensuite taillé pour enlever la fine couche de glace sur le dessus, et pour s'assurer de bien niveler

l'homogénat, et d'avoir une épaisseur de coupe homogène. Ensuite, le guide de verre du cryostat est ajusté afin de produire des coupes de 25 µm d'épaisseur. Une fois la coupe obtenue, celle-ci est délicatement aplatie à l'aide d'un pinceau, et, toujours avec un pinceau, le polymère entourant la coupe est retiré. La coupe d'homogénat est alors montée sur une lamelle de microscope, et celle-ci est déposée sur une pièce métallique à température de la pièce, décongelant la coupe sur la lamelle et l'empêchant de bouger davantage. Après évaporation de l'eau macroscopique, et préalablement à l'analyse, la coupe est trempée 30 secondes dans deux solutions d'isopropanol 70 % et 90 % respectivement, afin de retirer le plus possible les lipides.⁶⁵ La coupe est ensuite entreposée 15 minutes dans un dessiccateur en attendant l'analyse.

2.1.4 Préparation des solutions étalons

Toutes préparations de solutions étalons et de solution contenant des anticorps ont été effectuées en chambre froide à 4 °C, et maintenues à cette température jusqu'à leur utilisation.

Les aliquots de protéines cibles et d'anticorps sont décongelés à 4 °C, et ensuite dilués dans une solution saline de tampon phosphate pH 7,4 à la concentration désirée. Les solutions étalons obtenues sont entreposées à 4 °C jusqu'à leur utilisation, toujours prévue le jour même de leur préparation. Le mince volume restant des aliquots est disposé de façon adéquate, afin d'éviter de travailler avec des solutions mères ayant subi plus d'un cycle de gel/dégel.

2.2 Analyses en SPR

2.2.1 Instrumentation

Toutes mesures SPR ont été effectuées à l'aide d'un appareil de type P4SPR d'Affinité instruments. Les prismes utilisés à la base des capteurs SPR sont des prismes de verre, et leurs dimensions exactes sont présentées en annexe. Le P4SPR est un instrument portable, comportant deux ports d'injections, quatre sources lumineuses polychromatiques de type LED, et un spectrophotomètre. Les deux ports d'injections servent respectivement pour les injections d'analytes et de références.

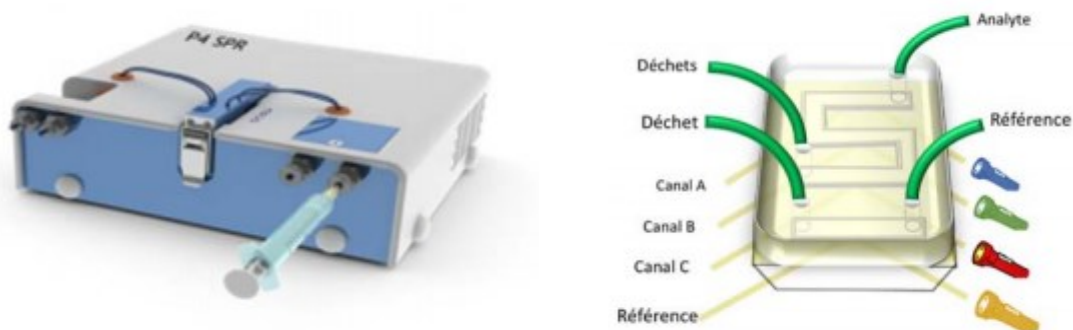


Figure 20. À droite, P4SPR d’Affinité instruments, et à gauche, schéma démontrant le système d’injection dans une cellule fluidique sur un prisme à l’intérieur d’un P4SPR.¹⁴

Tel que démontré à la figure 20, une cellule microfluidique composée de polydiméthylsiloxane (PDMS), est insérée à l’intérieur du P4SPR, afin de garder l’étanchéité et de permettre les injections. La cellule comporte deux micropassages, l’un en ligne droite pour la référence, et l’autre en forme de S pour les analytes. La configuration en S permet à l’appareil de mesurer l’indice de réfraction à 3 endroits sur la surface du capteur, et donc chaque analyse est mesurée en triplicata. Les canaux de lumières A, B et C sont donc attribués à l’analyse tandis que l’autre est pour la référence.

2.2.2 Préparation des capteurs

La procédure de préparation des capteurs est essentiellement la même que la procédure utilisée avec les prismes de type SF11 pour l’imageur SPR, détaillé un peu plus loin dans ce présent chapitre. Cependant, le chrome et l’or sont déposés sur la surface des prismes avec un appareil de pulvérisation cathodique de marque Cressington 308R. De plus, les étapes de fonctionnalisation de la surface, une fois la monocouche auto-assemblée sur place, sont faites directement dans le P4SPR, permettant de suivre en temps réel la fonctionnalisation avec le signal SPR.

2.2.3 Production de résultats

Une fois le prisme fonctionnalisé, celui-ci peut rester à l’intérieur de l’appareil pour l’analyse qui s’en suit. Deux mL d’une solution de PBS à pH 7,4 sont injectés afin de nettoyer

l'éthanolamine restant pendant deux minutes. Les échantillons contenant l'analyte sont ensuite injectés de façon successive, avec un temps d'attente de 20 minutes entre chaque injection afin de bien permettre l'adsorption. Il est très important d'injecter avec précaution et de garder le débit constant afin d'éviter d'introduire des bulles d'air dans le système, ce qui altérerait de façon considérable le signal SPR. Les échantillons sont introduits du moins concentré au plus concentré.

2.3 Analyse en imagerie SPR

2.3.1 Instrumentation

Toutes les analyses en imagerie SPR ont été effectuées à l'aide d'un appareil d'Horiba, soit le SPRi-Lab+, contrôlé par le logiciel SPRi-View L4.0. Les prismes utilisés à la base des capteurs SPRi sont des prismes de verre optique dense, de type SF11. Leur indice de réfraction est de 1.7847, et les dimensions exactes sont présentées en annexe.



Figure 21. SPRi-Lab+, instrument d'imagerie SPR d'Horiba⁶⁶

Au départ, l'instrument d'Horiba a principalement été conçu afin d'effectuer des mesures de cinétique en temps réel, et en solution. De fait, il est possible de remarquer sur la figure 21 les tubes d'injections situés sur le haut de l'appareil. Les échantillons sont donc normalement liquides, et injecté à l'aide d'une cellule fluide fermée. Lors de la prise de données, cet instrument utilise habituellement un faisceau à angle fixe, et ce, tout au long de l'acquisition. Cependant, d'importantes modifications ont dû être apportées à l'instrument afin de permettre à celui-ci d'effectuer les analyses présentées dans ce mémoire, soit de l'imagerie

SPR en 3 dimensions et en temps réel. En effet, l'imageur a été modifié de façon à produire des images quantitatives et régiosélectives, en temps réel, de molécules cibles s'adsorbant sur une surface fonctionnalisée avec des capteurs correspondants. Les modifications sont principalement les travaux de Simon Forest, effectués en 2015, et sont brièvement présentées dans ce mémoire.²³

2.3.1.1 Modifications apportées à la cellule fluidique

Tel que mentionné plus haut, la cellule fluidique standard de l'appareil est conçue pour recevoir des échantillons liquides, par injection. Elle a donc deux objectifs, soit de maintenir le capteur en place pour la durée de l'expérience, en plus de garder l'étanchéité à la surface de celui-ci. Cependant, l'obtention de mesures d'imageries telle que présentée dans ce mémoire nécessite le dépôt d'échantillons, préalablement montés sur une lamelle de microscope, directement sur le capteur. Avec cette cellule fluidique, il est donc nécessaire d'ouvrir la fluidique entre la prise de référence et la prise de mesure, et ce pour y déposer l'échantillon. Une fois la fluidique refermée, l'échantillon subi trop de pression saturant ainsi le signal SPR, la fluidique ne peut maintenir l'étanchéité, et la référence est obsolète étant donné les changements de position du capteur suite à l'ouverture et la fermeture. Une autre conception de fluidique a donc été fabriqué et mis de l'avant, afin de permettre la prise d'images de tissus biologiques. Cette cellule comporte une ouverture sur le dessus, laissant la surface du capteur à l'air libre. Les injections ne sont maintenant plus possibles, mais la nouvelle cellule fluidique atteint tout de même ses 2 objectifs, qui sont encore une fois de garder l'étanchéité et de maintenir le capteur en place. L'ouverture sur le dessus de cette fluidique a été spécialement conçu de façon à comporter les mêmes dimensions des lamelles de microscope sur lesquelles sont montés les tissus biologiques. En effet, l'air de cette ouverture est d'environ 1 cm^2 , pour un volume de 1 mL. Ce faisant, une fois les lamelles déposées sur le capteur, la surface de la membrane de nylon est quasi totalement recouverte par l'échantillon, l'empêchant ainsi de sécher, ce qui aurait pour effet d'interrompre le transfert de biomolécules vers la surface d'or.

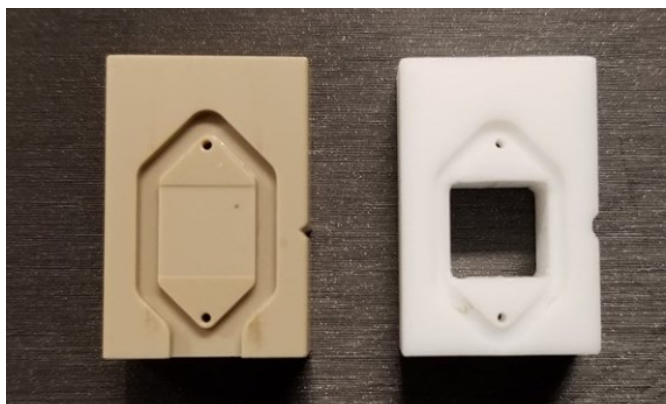


Figure 22. Cellules fluidiques pour l'imageur SPR. À gauche, la cellule d'origine d'un volume d'environ 0,2 mL, et à droite, la cellule conçue pour le projet (l'ouverture au centre est de 10 mm par 10 mm).

Maintenant muni d'une cellule fluidique permettant l'obtention d'images de tissus ou d'homogénats biologiques, un problème persiste. En effet, il est nécessaire, avant la prise de mesure, de fonctionnaliser la surface d'or avec un biocapteur spécifique aux molécules cibles. La fonctionnalisation de la surface nécessite un système fluidique fermé, permettant les injections successives. Une autre cellule fluidique a donc été créée, mais cette fois-ci complètement indépendante de l'instrument d'Horiba. Cette nouvelle cellule consiste à simplement pouvoir injecter, de façon étanche et successive les solutions nécessaires à la fonctionnalisation d'une surface d'or. Son volume est d'environ 0,2 mL, et ses dimensions sont présentées en annexe.

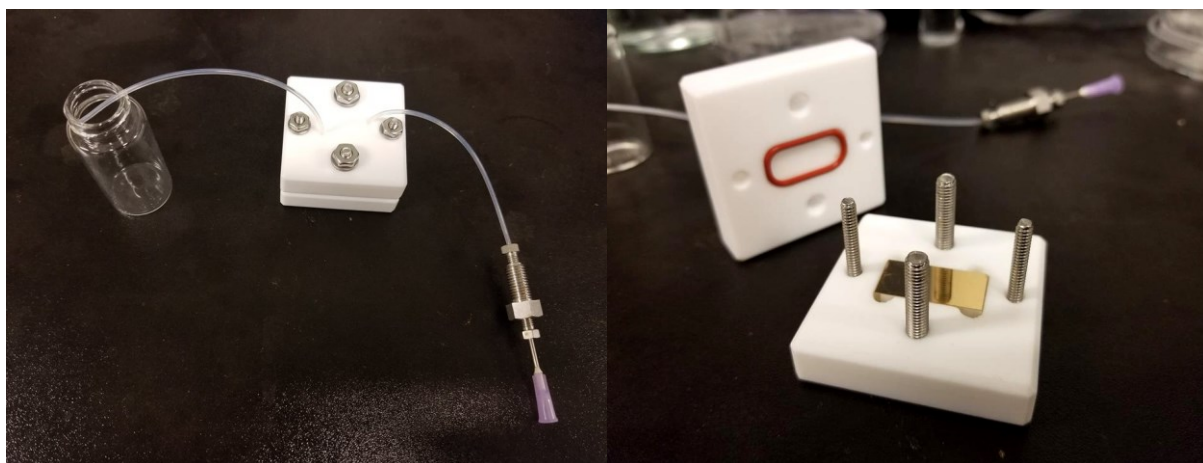


Figure 23. Cellule fluidique indépendante conçue afin de fonctionnaliser la surface d'or. À gauche, la cellule fermée, permettant les injections successives, et à droite, la cellule ouverte.

2.3.1.2 Modifications effectuées à l'imageur SPR

Encore une fois, étant donné qu'à la base l'imageur d'Horiba est destiné à recevoir des échantillons liquides par injections, plusieurs modifications ont dû y être apportées afin de permettre la prise d'images telles que présentées dans ce mémoire. Brièvement, toutes les composantes obstruant le capteur SPR ont été retirées afin d'avoir accès à la surface du prisme, pour y déposer les échantillons. Les composantes entourant la fluidique d'Horiba ont aussi été retirées, afin de laisser place aux nouvelles fluidiques. Les composantes optiques de l'appareil sont restées intactes.

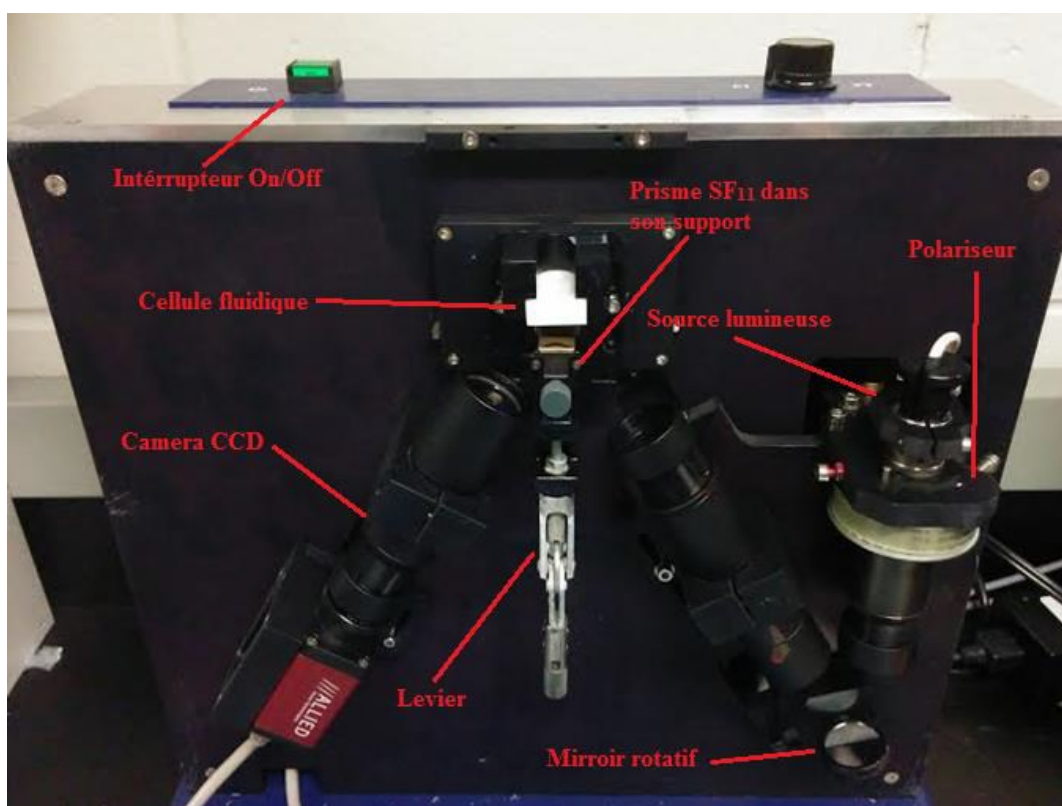


Figure 24. Configuration finale de l'imageur d'Horiba SPRi-Lab+. ²³

2.3.2 Préparation des capteurs

2.3.2.1 Préparation de la monocouche auto-assemblée

Tel que mentionné, les prismes utilisés à la base des capteurs SPRi sont des prismes de verre optique dense, de type SF11. Ceux-ci sont préalablement immergés dans une solution piranha. Cette solution, composée d'un mélange 1:3 respectivement de peroxyde d'hydrogène

30 % et d'acide sulfurique 18 M, a pour but de nettoyer toute molécule organique pouvant se trouver à la surface des prismes. Les prismes y reposent 90 minutes, et sont ensuite rincés vigoureusement avec de l'eau déionisée et de l'éthanol, avant d'être séchés à l'aide d'un jet d'azote. Une fois secs, 2 nm de chrome et ensuite 50 nm d'or sont déposés sur les prismes avec un appareil de déposition de métaux de type E-Beam. Les prismes sont ensuite immergés dans une solution de diméthylformamide (DMF) contenant 1 mM de peptide, durant 16 heures. Cette étape a pour but de fonctionnaliser les surfaces d'or des prismes avec une monocouche auto-assemblée d'un peptide composé de leucine, d'histidine et d'acide aspartique (3-MPA-LHDLHD). Les prismes sont ensuite rincés abondamment à l'éthanol afin de laver le surplus de LHDLHD et de DMF, et séchés à l'aide d'un doux jet d'azote. À ce moment, les prismes peuvent être entreposés, au sec et le plus possible à l'abri de la lumière, un maximum de quelques jours avant leur utilisation.

2.3.2.2 Préparation du biocapteur spécifique

Le jour de leur utilisation, une autre étape de fonctionnalisation est effectuée à l'aide de la fluidique indépendante (figure 23), afin de rendre le capteur spécifique à une biomolécule cible. En effet, des anticorps sont greffés à la monocouche auto-assemblée en utilisant la chimie classique du EDC/NHS, suivant un protocole auparavant développé au sein du groupe de recherche du professeur Masson.⁴⁴ Une fois le prisme à l'intérieur de la fluidique, 2 mL d'eau déionisée sont injectés afin d'hydrater la monocouche auto-assemblée de peptide durant 2 minutes. Ensuite, 500 μ L d'une solution 1:1 de 350 mM d'EDC et de 110 mM de NHS sont injectés pour 4 minutes, afin d'activer le groupement carboxyle de l'acide aspartique en bout de chaîne du peptide. La surface du prisme est ensuite nettoyée pendant 2 minutes avec 2 mL de solution tamponnée au phosphate (PBS) à pH 4,5. Par la suite, 300 μ L d'une solution d'anticorps à 1,5 μ M dans du PBS à pH 4,5 est injectée, et laissée à réagir pendant 15 minutes. Ensuite, les sites à la surface restant activés par le NHS sont désactivés par 1 mL d'une solution d'éthanolamine 1 M à pH 8,5 pendant 5 minutes. La surface du prisme est ensuite lavée par l'injection de 2 mL de PBS à pH 7,4, pendant 2 minutes. À cette étape, l'anticorps est fixé à la surface, et donc le capteur est prêt à être transféré vers l'imageur SPRi. Pour ce faire, 0,3 mL d'air sont injectés, afin de réduire le volume de la bulle de PBS à la surface du prisme une fois la fluidique ouverte, tout en gardant la surface humectée. De fait, le séchage de la surface du

prisme entraînerait une dénaturation des anticorps, et donc ces derniers perdraient leur activité . La production d'image SPR doit se faire maximum quelques minutes suite à cette étape.

2.3.3 Production d'images SPR

Une membrane de nylon d'une épaisseur d'environ 100 μm et ayant des pores des 0,45 μm de diamètre est découpée aux dimensions de la surface d'or. Celle-ci est ensuite humectée dans une solution aqueuse de formate d'ammonium 150 mM, avant d'être délicatement déposée sur la surface déjà humectée du prisme (celle-ci a pour rôle de diminuer la diffusion latérale des protéines). Le prisme est alors monté dans l'imageur SPR, et maintenu en place grâce à la fluide ouverte. Une image de référence est prise ; 100 images sont acquises de 53,5° à 63,5° à des intervalles de 0,1°, pour les polarisations S et P. L'échantillon, monté sur une lamelle de microscope, est ensuite très délicatement déposé face à la membrane, de façon à ce que la section tissulaire soit en contact direct avec la membrane.

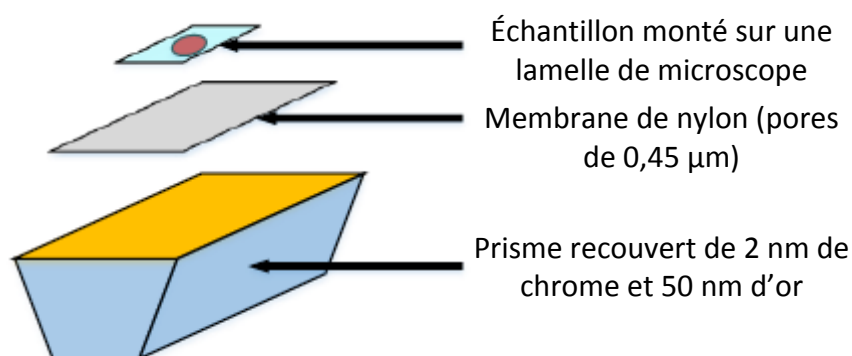


Figure 25. Schéma du biocapteur SPRi.²³

Des séries images sont acquises encore une fois de 53,5° à 63,5° à des intervalles de 0,1°, aux temps voulus lors du transfert de biomolécules vers la surface. Une fois le transfert terminé, les séries d'images obtenues sont extraites et traitées avec le logiciel de traitement de données MATLAB R2014a (le code utilisé est présenté en annexe).

Chapitre 3 Développement d'une méthode d'imagerie SPR

L'imagerie SPR, s'affichant comme une technologie incontournable dans le domaine de la biodétection, représente une méthode de choix pour l'obtention d'images qualitatives, quantitatives et régiosélectives de minces couches tissulaires. En effet, tel qu'expliqué dans le chapitre 1, la SPR répond à tous les critères nécessaires à l'atteinte de l'objectif de recherche : c'est une technique simple, précise, rapide et capable d'effectuer des analyses en continu et en temps réel sans marquage préalable de l'analyte. Précédemment aux travaux de ce mémoire, des images SPR quantitatives de minces coupes tissulaires ont été obtenues. Des coupes de rein de souris, de 20 μm d'épaisseur, ont pu être analysées quantitativement par SPRi, suivant une méthode développée au sein du groupe Masson, à partir de laquelle sont fondés les travaux de ce mémoire.³ Cette dite méthode utilise la SPRi pour quantifier de façon absolue, sans chercher à être spécifique envers un analyte particulier, pour ensuite sur une même sonde obtenir des images MALDI-MS plus qualitatives. La combinaison des deux techniques apportait des informations qualitatives, quantitatives et régiosélectives sur la constitution biologique du tissu analysé.

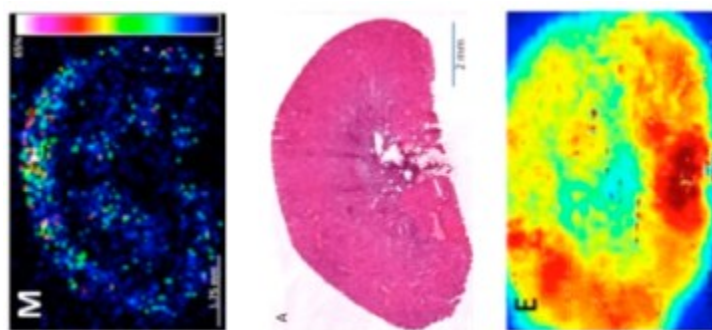


Figure 26. Images obtenues d'un même rein de souris grâce à la méthode développée au sein du groupe Masson. À gauche, une image MALDI-IMS, au milieu, le tissu coloré à l'hémaroxyline et à l'éosine, et à droite, une image SPR.³

Cependant, la combinaison de ses deux techniques ne permet pas la quantification absolue de chacune des biomolécules adsorbées à la surface de la sonde, et encore moins la détermination de leur concentration dans le tissu d'origine. En effet, la difficulté est rencontrée

lors de l'identification des ratios de protéines en spectrométrie de masse ; il est impossible d'attribuer des ratios de protéines spécifiques à d'exactes quantités, la SPRi fournissant des quantités totales de biomatériau. Les travaux de ce mémoire sont donc dédiés à la résolution de cette lacune. Ici, l'approche préconisée est le développement d'une chimie de surface dans le but d'obtenir une sonde SPRi étant spécifique à un analyte cible. En effet, en contrôlant l'adsorption des protéines à la surface de la sonde en y greffant par exemple un ou plusieurs anticorps, le signal SPR obtenu serait directement attribuable à un analyte connu. La quantification absolue de biomolécules cibles au sein de coupes tissulaires minces deviendrait donc possible.

Le développement de la méthode SPRi passera donc par l'étude de fonctionnalisation d'anticorps sur une sonde SPRi, et ensuite par l'étude du transfert de biomasse, d'un tissu, vers une sonde fonctionnalisée.

3.1 Étude de fonctionnalisation

L'étude de fonctionnalisation a pour but de développer une sonde SPRi avec une surface capable d'être spécifique à un analyte d'intérêt. Tel que mentionné plus haut, les images SPR obtenues précédemment dans ces travaux sont quantitatives de façon absolue. La surface de la sonde utilisée était hydrophobe (dodécane-thiol), et donc les biomolécules s'adsorbaient de façon non spécifique et le signal total était mesuré. L'idée ici est donc de développer une surface discriminante, capable de cibler un analyte précis. La chimie de l'immunoglobuline G (IgG) étant bien connue dans le groupe Masson, la paire anti-IgG et IgG a semblé être un bon point de départ. En effet, les résultats SPR de l'IgG sur une surface fonctionnalisée avec de l'anti-IgG sont bien documentés^{44, 67} au sein du groupe, et donc il est possible de comparer les nouveaux résultats avec les anciens.

Cependant, la fonctionnalisation des sondes SPR avec des anticorps se fait toujours par injections successives, juste avant l'analyse d'échantillons. Les sondes sont donc fonctionnalisées par injections grâce à une cellule fluidique directement dans un appareil SPR P4-SPR, (ou SPRi), et après une étape de rinçage les échantillons contenant l'analyte d'intérêts sont injectés et analysés. Cette méthode pose problème, dans la mesure où l'obtention d'images SPR de coupes tissulaires nécessite une cellule fluidique ouverte, pouvant accueillir une lamelle

de microscope. Il est donc impossible d'effectuer la fonctionnalisation par injections successives. Ceci pose problème d'autant plus qu'il est connu que les anticorps peuvent grandement perdre leur activité lorsqu'exposés à l'air trop longtemps sur une surface sèche. Le premier défi est donc le suivant : fonctionnaliser une surface avec des anticorps (anti-IgG), de façon à permettre la prise de mesure en fluide ouverte, et ce sans affecter l'activité du biocapteur.

3.1.1 Analyses en SPR

D'entrée de jeu, les prismes compatibles avec l'imageur SPR d'Horiba sont assez dispendieux, c'est pourquoi les premières analyses sont effectuées avec l'appareil P4-SPR. Les premières analyses ont pour but de déterminer s'il est possible de greffer des anticorps sur une surface sans utiliser une cellule fluide fermée. Les premiers tests sont donc effectués sur des prismes SPR ayant comme monocouche l'acide 16-mercaptophexadécanoïque (16-MHA). Cette surface, moins coûteuse qu'un peptide, possède la fonction acide carboxylique en bout de chaîne et donc le greffage d'anticorps. Étant donné que les premières analyses sont effectuées en matrice simple (PBS à pH 7,4), une monocouche de 16-MHA semble adéquate. Pour chaque analyse, 3 tests sont nécessaires afin de tirer une conclusion adéquate. D'abord, un test contrôle anti-IgG et IgG, avec une fonctionnalisation par injections successives et injection d'échantillons par la suite. Ensuite, un test est effectué avec un prisme ayant été fonctionnalisé sans l'usage d'une cellule fluide (tel qu'indiqué à la figure 27). Une fois fonctionnalisée, la sonde SPR est insérée à l'intérieur de l'appareil SPR P4, et l'échantillon est injecté.

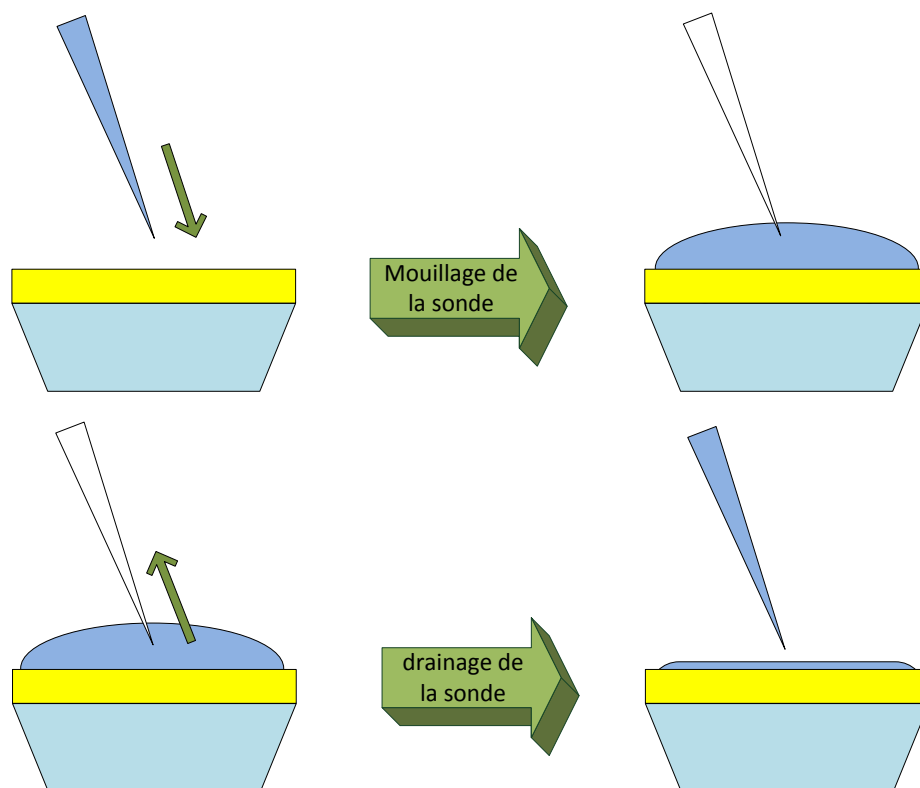


Figure 27. Fonctionnalisation d'une sonde sans fluidique fermée. Les solutions sont ajoutées et drainées les unes après les autres sur la sonde à l'aide d'une micropipette, et sont laissées à réagir avec la monocouche auto-assemblée.

Finalement, le troisième test est en fait un contrôle négatif, afin de mesurer le niveau d'adsorption non spécifique. La monocouche de la sonde est donc seulement fonctionnalisée avec de l'éthanolamine, sans le greffage d'anticorps. Ici, le but est de comparer le premier test, soit le contrôle, avec le deuxième test. Si la surface est bien fonctionnalisée sans fluidique fermée, les signaux obtenus aux deux tests devraient être semblables. Le troisième, lui, a seulement pour but de vérifier l'apport du signal non spécifique dans le signal total obtenu au test deux. Malheureusement, bon nombre de ces tests ont démontré qu'il est impossible de fonctionnaliser une surface avec des anticorps par mouillages et drainages successifs. Même avec l'usage du peptide LHDLHD comme monocouche auto-assemblée, les résultats obtenus pour les deuxième et troisième tests ne sont jamais reproductibles, et toujours très loin des résultats obtenus pour les tests contrôle.

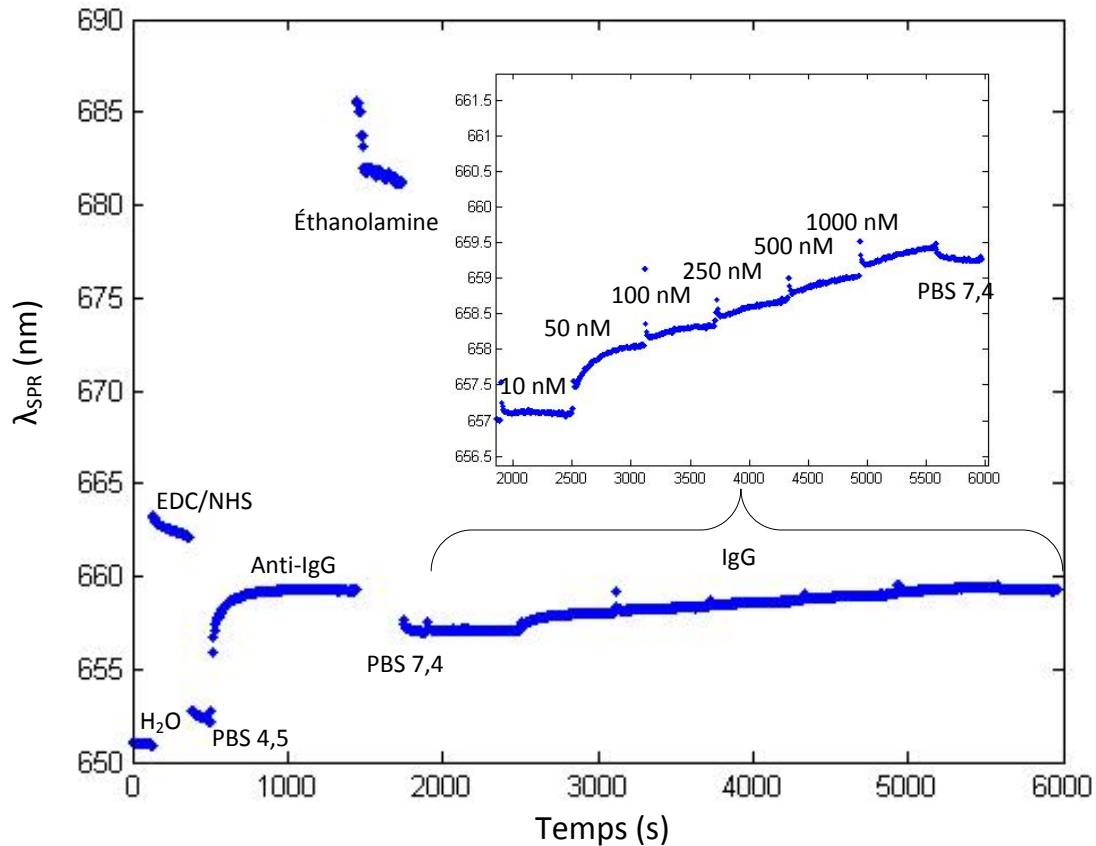


Figure 28. Sensogramme SPR typique obtenu pour un test contrôle. Ici, la surface est recouverte du peptide LHDLDH, et est ensuite fonctionnalisée pour devenir un biocapteur spécifique à l'IgG.

Effectivement, si le greffage s'effectuait avec succès lors du deuxième et troisième test, un sensogramme semblable à l'agrandi de la figure 28 serait observé. Or, aucun signal de la sorte n'est observé, seulement des signaux semblables au bruit de fond, sans aucune reproductibilité, ce qui laisse croire que tout le matériel en solution s'adsorbe (ou non) à la surface de façon complètement aléatoire d'un test à l'autre. Ce genre de résultat, présenté à la figure 29, démontre qu'il n'y a aucune spécificité, ni aucune reproductibilité d'un test à l'autre.

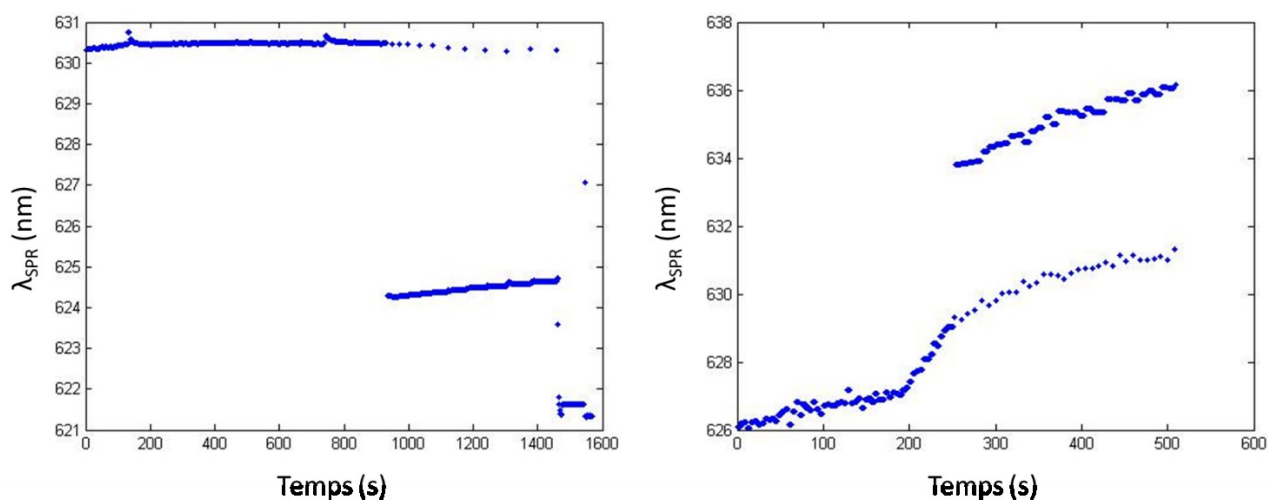


Figure 29. Deux exemples de sensogrammes obtenus pour des tests de fonctionnalisation hors fluide. Ici, les surfaces sont recouvertes du peptide LHDLDH, et une solution d'anti-IgG est déposée à la surface en vue de la fonctionnalisation.

Ces résultats sont probablement dus à une perte d'activité de l'anticorps à la surface, ou bien simplement un mauvais ancrage de celui-ci à la surface due aux multiples drainages et mouillages. En effet, à chaque drainage il est impossible de sécher complètement la surface de la sonde (voir schéma de la figure 27), et donc une certaine quantité de solution reste en surface, diluant et contaminant la solution suivante, ainsi de suite jusqu'à la fin de la fonctionnalisation. Il était présumé que cette petite quantité de solution permettrait aux anticorps à la surface de rester humectés et donc de conserver leur activité, mais les résultats obtenus démontrent une tout autre conclusion. En dernier essai, un mince jet d'azote fut délicatement appliqué sur la surface après chaque drainage afin de complètement assécher la sonde. Encore une fois, aucun signal constructif n'est obtenu.

Une autre approche est donc mise de l'avant afin de fonctionnaliser les sondes d'imagerie SPR. L'astuce est la suivante : fonctionnaliser la surface par injections successives à l'aide d'une cellule fluide fermée, mais externe à l'imageur SPR. Le prisme, muni de sa monocouche, est donc inséré dans la cellule fluide, puis fonctionnalisé par injections successives. Par la suite, celui-ci est retiré de la cellule pour être inséré dans l'imageur SPR, où les analyses seront effectuées. Cette cellule fluide est illustrée à la figure 23 du chapitre 2. Les premiers tests effectués avec cette méthode consistent donc en un test de contrôle, afin de

voir si les signaux obtenus sont les mêmes que les signaux obtenus précédemment pour les tests de contrôle. Une droite d'étalonnage pour l'IgG est donc effectuée. Rapidement, les résultats obtenus sont plus prometteurs avec cette approche. Effectivement, les premiers tests démontrent qu'il y a bel et bien greffage d'anticorps à la surface de la sonde, car il y a une réponse avec différentes concentrations d'IgG.

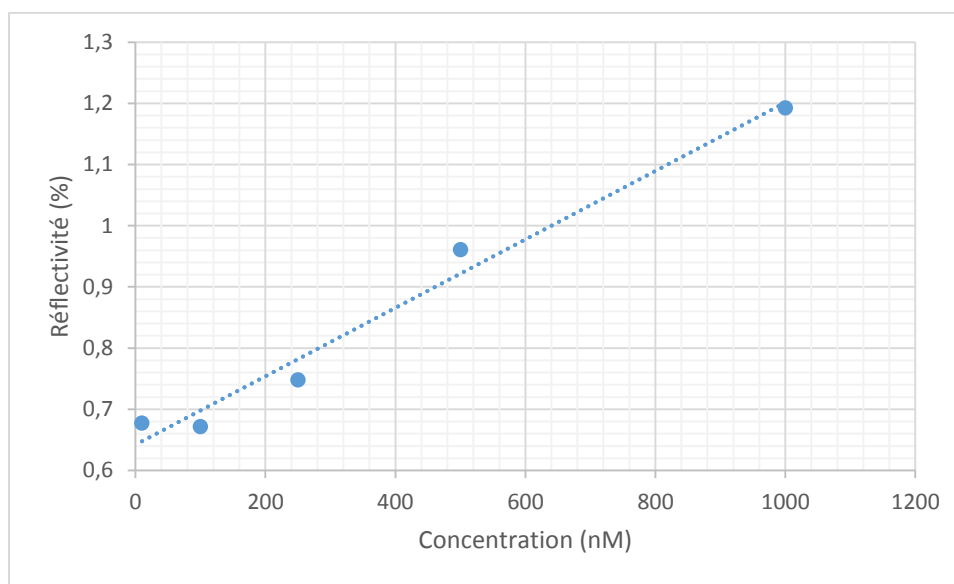


Figure 30. Courbe d'étalonnage d'IgG, obtenue à l'aide de l'imageur SPR ($R^2 = 0,978$).
La sonde SPR est fonctionnalisée avec la cellule fluide indépendante.

Le graphique illustré à la figure 30 démontre que la sonde capte bel et bien l'IgG injecté, malgré un coefficient de corrélation discutable. À noter ici l'absence de barre d'erreur ; le test a seulement été effectué une fois, l'objectif étant de valider le fait que les anticorps conservent leur activité malgré une fonctionnalisation externe. Ce résultat, bien qu'encourageant, reste loin de l'objectif principal, qui est de créer une méthode d'imagerie SPR permettant d'imager des coupes tissulaires. Cependant, on sait maintenant qu'il est possible de fonctionnaliser une surface avec des anticorps à l'aide d'une fluide fermée et externe à l'imageur SPR. Les prochains tests tenteront de se rapprocher des conditions expérimentales pour des analyses avec des tissus biologiques. Les analyses se feront donc en imagerie SPR, avec des cibles plus susceptibles que l'IgG de se retrouver dans un foie de souris.

3.1.2 Analyses avec l'imageur SPR

Afin de se rapprocher encore plus des conditions expérimentales entourant l'objectif, la cible utilisée est désormais l'hémoglobine, avec son anticorps l'anti-hémoglobine. En effet, maintenant qu'il est possible de fonctionnaliser avec succès une sonde d'imagerie SPR avec des anticorps sans perdre l'activité de ceux-ci, il est intéressant d'effectuer des analyses avec une cible plus susceptible de se retrouver dans une coupe tissulaire. L'hémoglobine est une protéine formée de quatre sous-unités, globalement plus petite que l'IgG (environ 65 000 Da pour l'hémoglobine versus environ 150 000 Da pour l'IgG). Une courbe d'étalonnage est donc produite avec 6 solutions étalons d'hémoglobine. Les analyses sont effectuées de la même façon que précédemment, c'est-à-dire avec la fonctionnalisation de la sonde en fluide externe, puis analyse en imagerie SPR. Les résultats obtenus, présentés à la figure 31, viennent donc confirmer qu'il est possible de fonctionnaliser une sonde d'imagerie SPR à l'extérieur de l'imageur SPR, sans affecter l'activité des anticorps. En effet, le coefficient de corrélation obtenu pour cette courbe d'étalonnage démontre qu'il y a bel et bien corrélation entre la concentration d'hémoglobine en solution et le signal SPR mesuré. Les anticorps greffés à la surface conservent donc leur activité, et permettent la détection quantitative de l'analyte en solution.

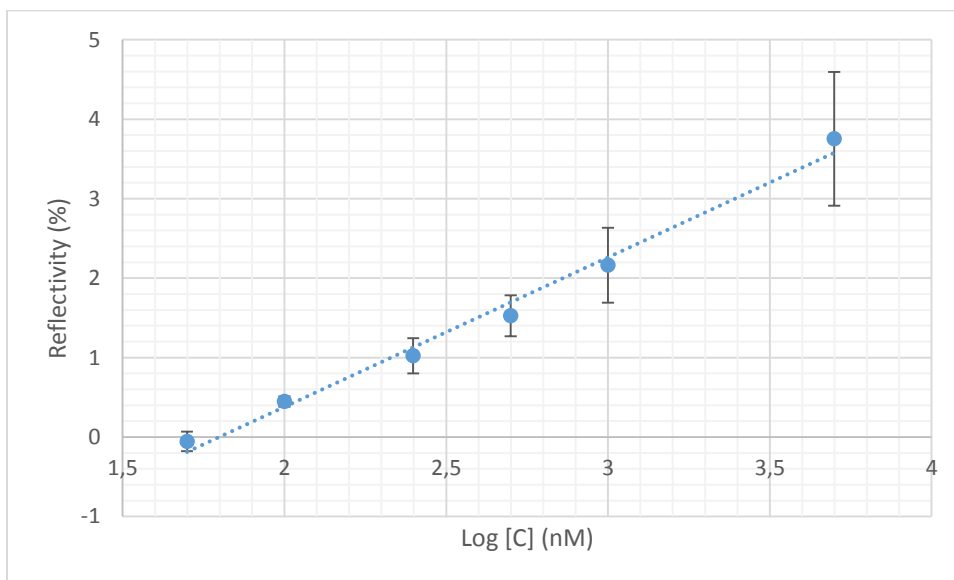


Figure 31. Courbe d'étalonnage d'hémoglobine obtenue à l'aide de l'imageur SPR ($n = 3$, $R^2 = 0,989$).

Bien que ces résultats sont encourageants, l'objectif principal est encore loin d'être atteint. De fait, la fonctionnalisation avec des anticorps est désormais possible, mais la prise de mesures se fait toujours par injections successives avec une fluidique fermée, alors qu'ultimement ce sont des coupes tissulaires qui seront déposées par fluidique ouverte, et les biomolécules auront à traverser une membrane avant de s'adsorber à la surface de la sonde. Effectivement, les travaux effectués précédemment dans le projet démontrent qu'un transfert du biomatériel au travers d'une membrane de nylon est nécessaire afin de réduire au minimum la diffusion latérale des biomolécules une fois en solution, et permet d'obtenir une empreinte tissulaire représentant le plus fidèlement possible le tissu d'origine.³ La membrane de nylon permet donc aux biomolécules de migrer du tissu jusqu'à la sonde au travers des pores d'un diamètre de 0,45 μm , limitant leur diffusion latérale.

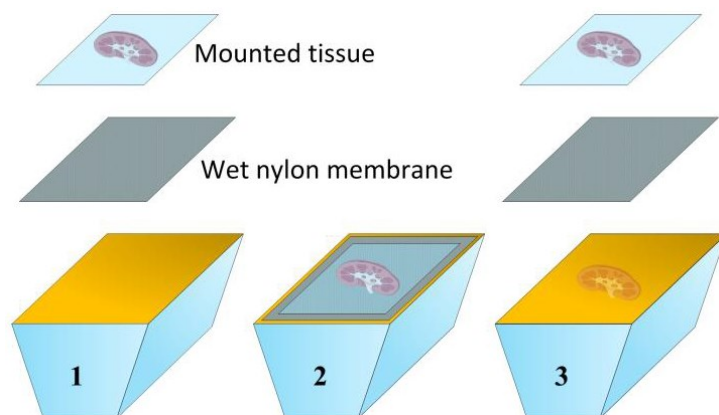


Figure 32. Transfert d'une coupe de rein de souris à travers une membrane de nylon vers une sonde SPRi. 1) la coupe tissulaire, montée sur une lamelle de microscope est déposée sur la sonde, séparée d'une membrane de nylon humecté de PBS. 2) Le transfert de biomolécules s'effectue au travers de la membrane, de façon à limiter la diffusion latérale. 3) La lamelle et la membrane sont retirées, et l'empreinte du rein reste sur la sonde.

La membrane offre aussi un avantage considérable ; elle ralentit l'adsorption du biomatériel à la surface de la sonde, permettant d'obtenir des images claires et évitant la saturation rapide du capteur. Ultimement, elle permet d'obtenir la quantité de matériel désirée à la surface, par exemple pour des analyses MALDI optimales, qui viendraient après les analyses SPR. L'ajout de la membrane aux analyses représente un incontournable, et donc la méthode préalablement développée au sein du groupe Masson par Simon Forest se doit d'être adaptée à

une sonde d'imagerie SPR maintenant fonctionnalisée avec des anticorps. Effectivement, maintenant que la fonctionnalisation est obtenue avec succès, c'est au tour du transfert de protéine au travers d'une membrane d'être abordé.

3.2 Étude de transfert de biomatériel au travers une membrane de nylon

Cette partie des travaux de ce mémoire consiste à elle seule le plus gros défi rencontré. En effet, lors de l'étude de transfert, de nombreux paramètres sont à considérer, et, due à des contraintes instrumentales, il est difficile d'en surveiller qu'un seul tout en gardant les autres constants. En bout de compte, il est attendu que les analyses d'imagerie SPR s'effectuent telles que présentées à la figure 32 ; les coupes tissulaires sont déposées une membrane de nylon sur le prisme, et les images sont prises lors du transfert des biomolécules. Maintenant que la fonctionnalisation est possible, il est nécessaire d'étudier l'effet de l'ajout de la membrane sur l'efficacité du biocapteur.

3.2.1 Étude de transfert avec une fluidique fermée

Les premiers tests ont d'abord consisté à reproduire une courbe d'étalonnage tel que présentée à la figure 31, mais cette fois-ci en ajoutant, sur la sonde à l'intérieur de la fluidique d'imagerie SPR, une membrane de nylon. Ces tests ont pour but de vérifier si la membrane a un effet sur l'activité du biocapteur à la surface de la sonde. Le prisme est donc fonctionnalisé à l'aide de la fluidique externe, pour ensuite être transféré dans l'imageur SPR. Par contre, à la différence des derniers tests, cette fois-ci une membrane humectée est déposée sur le prisme avant d'être scellée à l'intérieur de la fluidique de l'appareil, tel qu'indiqué à la figure 33. Les solutions étalons sont ensuite injectées successivement.

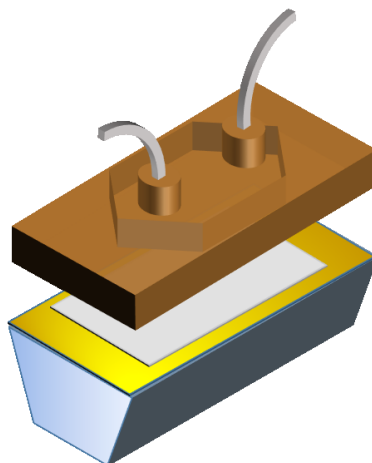


Figure 33. Membrane de nylon déposée sur une sonde d'imagerie SPR avant de sceller celle-ci dans la fluidique d'appareil d'imagerie.

Ici, il est connu qu'ultimement les biomolécules des échantillons sont appelées à traverser la membrane de haut en bas, et donc qu'une injection est loin des conditions expérimentales désirées. Cependant, les tests sont tout de même effectués afin de voir si une membrane déposée sur la sonde affecterait l'activité des anticorps à sa surface. L'idée est de varier le moins de paramètres à la fois.

Les résultats obtenus avec cette approche sont loin d'être concluant, sans pour autant être surprenant. En effet, la membrane à l'intérieur de la cellule fluidique empêche l'étanchéité de celle-ci, et donc il y a fuite autour de la sonde lors des injections. Une fuite entraîne la fin d'une analyse, étant donné qu'une partie de l'échantillon se retrouve sur les côtés du prisme, entravant les rayons lumineux et bloquant ainsi tous signaux. Plusieurs essais ont été effectués utilisant cette approche, en essayant plusieurs tailles de membranes, mais aucun ne fut concluant. En fait, le trop petit volume de la fluidique ne laisse pas de place à la membrane, et donc aucun signal n'est mesurable due aux fuites engendrées par les injections. Cette approche est donc abandonnée.

3.2.2 Étude de transfert par dépôt de solution étalon

Les derniers tests se montrant infructueux, avant de continuer le projet il resta nécessaire de déterminer si oui ou non les anticorps à la surface de la sonde gardent leur activité malgré la présence de membrane de nylon sur celle-ci. Cette fois-ci il est clair, la fluidique fermée ne peut

plus être utilisée lors des expériences d'imagerie SPR. La fluidique ouverte est donc mise de l'avant, afin d'explorer deux autres pistes. Après avoir fonctionnalisé le prisme avec les anticorps, une membrane de nylon humectée y est déposée, et celui-ci est inséré dans l'imageur SPR. Ici, la fluidique ouverte est utilisée afin de sceller le prisme, et un volume de solution étalon de 1000 nM y est déposé, de façon à exposer la surface au fluide, tel qu'indiqué à la figure 34.

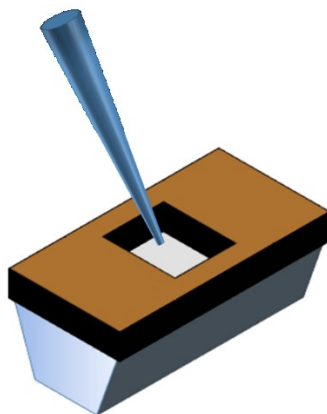


Figure 34. Dépôt d'une solution étalon sur une sonde d'imagerie SPR, sur laquelle est déposée une membrane de nylon. Celle-ci est scellée dans l'imageur SPR à l'aide de la cellule ouverte.

Une fois la solution étalon déposée sur la membrane, le signal SPR est mesuré en fonction du temps. Encore une fois, ici les résultats ne sont que trop peu concluants. En effet, les sensogrammes observés ne montrent que du bruit de fond, parfois accompagné d'un infime décalage qu'on attribue généralement en SPR aux variations thermiques. Un exemple est présenté à la figure 35, laquelle ne démontre aucun signal représentatif d'adsorption de molécules. Ce sensogramme indique qu'aucun signal n'est mesuré à la surface du capteur, et donc les légères fluctuations enregistrées ne sont dues qu'à du bruit de fond.

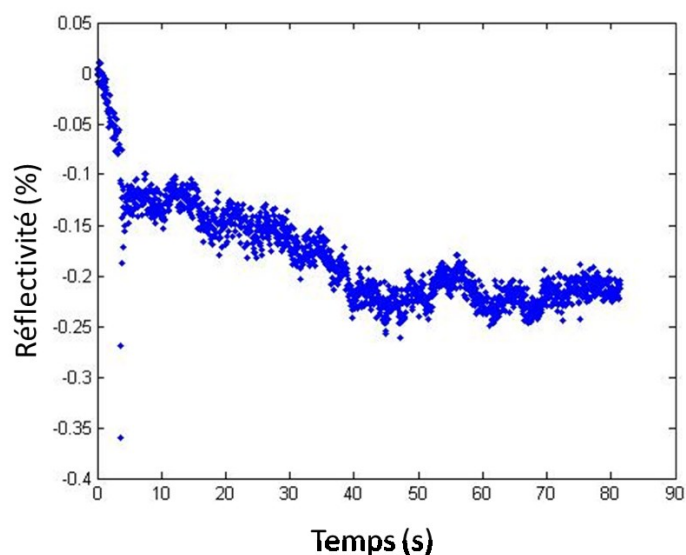


Figure 35. Sensogramme SPR observé après le dépôt d'une solution étalon de 1000 nM à l'intérieur de la cellule ouverte.

Il en est conclu ici que la gravité n'est probablement pas suffisante pour entraîner les protéines à traverser la membrane et se rendre jusqu'à la surface de la sonde. Même avec les solutions étalons les plus concentrées, aucun signal représentatif n'est mesuré.

3.2.3 Étude de transfert par dépôt d'étalons séchés

La deuxième approche est donc envisagée, soit celle de sécher une goutte de solution étalon sur une lamelle, et prendre une mesure d'imagerie telle qu'on l'aurait fait avec une coupe tissulaire. L'approche est donc la suivante : 25 μ L de l'étalon le plus concentré (5000 nM) sont déposés sur une lamelle, et laissés à sécher à température pièce. Pendant ce temps, le prisme est fonctionnalisé, et placé, avec la membrane humectée, à l'intérieur de l'imageur SPR avec la fluide ouverte. Une fois l'étalon séché, la lamelle est déposée sur la sonde, et une image SPR est prise après 45 minutes de transfert (tel qu'illustrée à la figure 32, seulement ici la lamelle comporte une goutte séchée d'étalon et non une coupe tissulaire). Selon les travaux effectués préalablement, 45 minutes représente un temps de transfert raisonnable, et devrait permettre d'accumuler amplement de protéine à la surface afin d'avoir un signal détectable.³ À l'instar de la première approche, ici un signal caractéristique est mesuré. En effet, il est possible d'observer la forme de la goutte d'étalon par imagerie SPR.

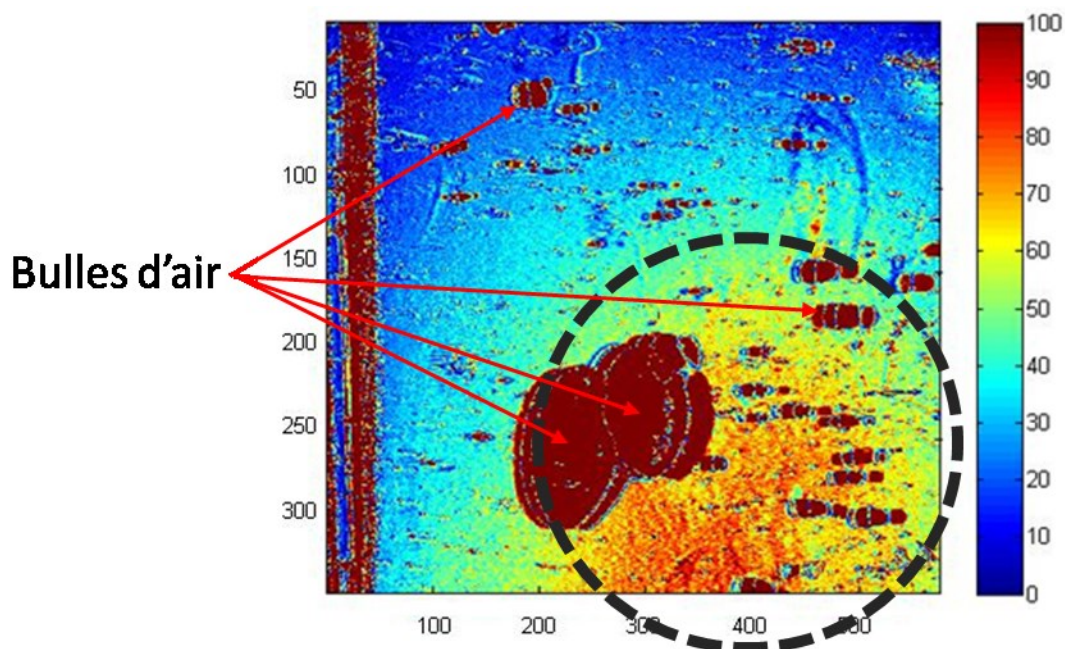


Figure 36. Image SPR de 25 μL d'étalon hémoglobine (5000 nM) séchés sur une lamelle et passés au travers une membrane de nylon. La sonde d'imagerie SPR est fonctionnalisée avec de l'anti-hémoglobine. L'échelle de couleur est en ng/cm^2 . L'image correspond approximativement à 10 x 10 mm.

Ici, il est possible d'apercevoir dans le bas de l'image l'empreinte de la goutte séchée, ce qui est très encourageant. Afin de faciliter l'interprétation de l'image obtenue, l'empreinte de la goutte est ici entourée d'un pointillé noir. L'empreinte est donc définie par un signal de forte intensité en son centre, traduit par une coloration orangée (on assume que le centre de la goutte contient une quantité plus importante de protéine). Ensuite, l'intensité du signal diminue plus on s'éloigne du centre, avec une coloration qui tire lentement vers le vert et le bleu ; l'échelle à droite de l'image est en ng/cm^2 . De fait, les données recueillies par l'imageur SPR sont converties en concentration surfacique (Γ), grâce à la relation entre l'épaisseur de l'adsorbat (d) et la densité de celui-ci (ρ).

$$d = \frac{-l_d}{2} \ln\left(1 - \frac{\Delta \theta_{SPR}}{m(n_a - n_s)}\right) \quad (8)$$

$$\Gamma = d\rho \quad (9)$$

Tel qu'exprimé à l'équation (8), l'épaisseur de l'adsorbat varie en fonction du changement de l'angle SPR mesurée ($\Delta\theta_{SPR}$), des indices de réfraction de l'adsorbat (n_a) et de la solution (n_s), en plus des propriétés plasmonique de la sonde SPR elle-même, soit la profondeur de pénétration (l_d) et la sensibilité (m). Étant donné que ces paramètres restent constants pour une même analyse SPR, la concentration surfacique peut donc être obtenue à partir de la variation de l'angle SPR. Donc, sur une image SPR telle qu'illustrée à la figure 36 une coloration bleue témoigne d'une faible quantité de matériel adsorbée, tandis qu'une coloration plus rouge témoigne d'une plus forte quantité adsorbée. Il faut comprendre ici que la goutte n'était pas centrée en fonction du cadre d'analyse, et donc l'empreinte est observée dans le coin inférieur droit. Les points rouge vin de formes diverses éparpillés sur l'image sont en fait des bulles d'air s'étant glissées entre la lamelle et la membrane. Aucun signal n'est donc mesurable à ces endroits. Celles-ci sont très difficilement évitables et surviennent de façon aléatoire, due à des contraintes instrumentales. Étant donné que les échantillons sont déposés à la main, il n'y a rien à faire mis à part procéder avec une délicatesse chirurgicale pour éviter les bulles. Il en est de même pour la bande verticale rouge foncé observée à gauche de l'image ; celle-ci est attribuable à un décalage des composantes optiques de l'appareil, cette bande ne comporte aucun plasmon.

Les prochains tests sont donc réorientés vers cette méthode, et d'autres concentrations d'étalons sont analysées. Effectivement, le but ici est d'obtenir une image de chacune des concentrations d'étalons (50, 100, 500, 1000 et 5000 nM), afin d'obtenir un étalonnage d'hémoglobine. À ce point, bien que les conditions expérimentales ne sont pas encore celles attendues, une quantification spécifique et régiosélective de l'hémoglobine représenterait un pas de géant vers l'objectif final. Le prochain étalon analysé est donc celui le plus susceptible de donner un signal, soit celui de 1000 nM. L'image attendue pour ce test est une image semblable à la figure 36 ; une empreinte de goutte, caractérisée par un signal un peu moins prononcé (donc qui tendrait moins vers le rouge, étant donné la plus faible quantité de matériel déposé à la

surface). Malheureusement, le résultat obtenu ici est tout autre que celui attendu : aucune forme n'est discernable sur l'image.

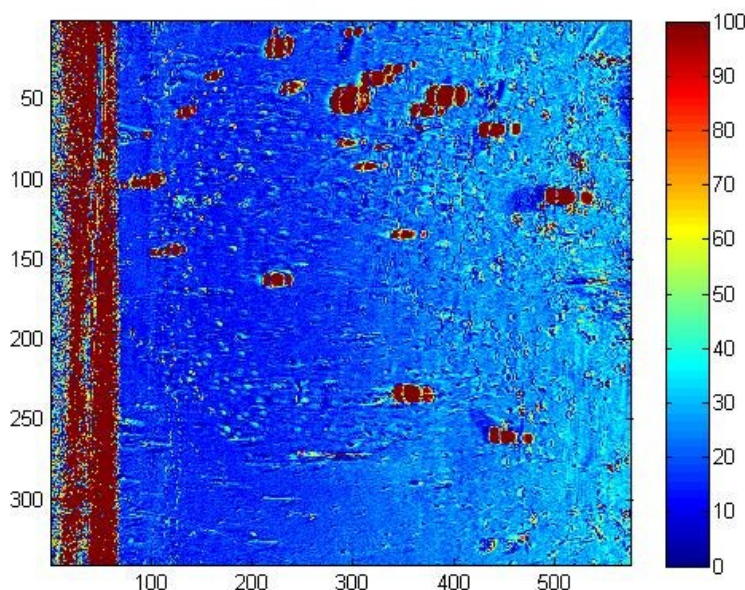


Figure 37. Image SPR de 25 μL d'étalon hémoglobine (1000 nM) séchés sur une lamelle et passés au travers une membrane de nylon. La sonde d'imagerie SPR est fonctionnalisée avec de l'anti-hémoglobine. L'échelle de couleur est en ng/cm^2 .

L'absence de signal à la figure 37 est démontrée par le fond bleu relativement homogène observé sur toute la surface analysée, et on ne voit que les bulles d'air qui parsèment l'image. Deux hypothèses sont avancées afin d'expliquer l'absence de forme tel qu'attendu. Premièrement, il est possible que 45 minutes soient trop peu pour permettre un transfert des analytes de l'étalon de 1000 nM au travers de la membrane de nylon, et donc l'hémoglobine n'atteint pas la surface de la sonde. Deuxièmement, en regardant l'image obtenue il est possible de remarquer un décalage du signal de droite à gauche. Effectivement, le côté droit de l'image est d'un bleu pâle, tandis que le côté gauche est d'un bleu beaucoup plus foncé. Ceci indiquerait que l'analyte se solubilise et se dilue dans le PBS présent sur la sonde, et donc il y a perte de régiosélectivité avant le transfert. L'empreinte de la goutte séchée perd sa forme, et les protéines s'étalent sur toute la surface avant le transfert. L'adsorption est donc diluée sur l'étendue de la surface, alors aucun centre plus concentré n'est observé. Afin d'en vérifier la possibilité, un test cinétique est effectué. Cette analyse consiste à acquérir une image à chaque 5 minutes afin de

suivre le transfert de l'analyte ainsi que son adsorption à la surface. Cette fois-ci, c'est l'étalon de 5000 nM qui est analysé, afin d'assurer l'obtention d'un signal. Les résultats obtenus sont inattendus.

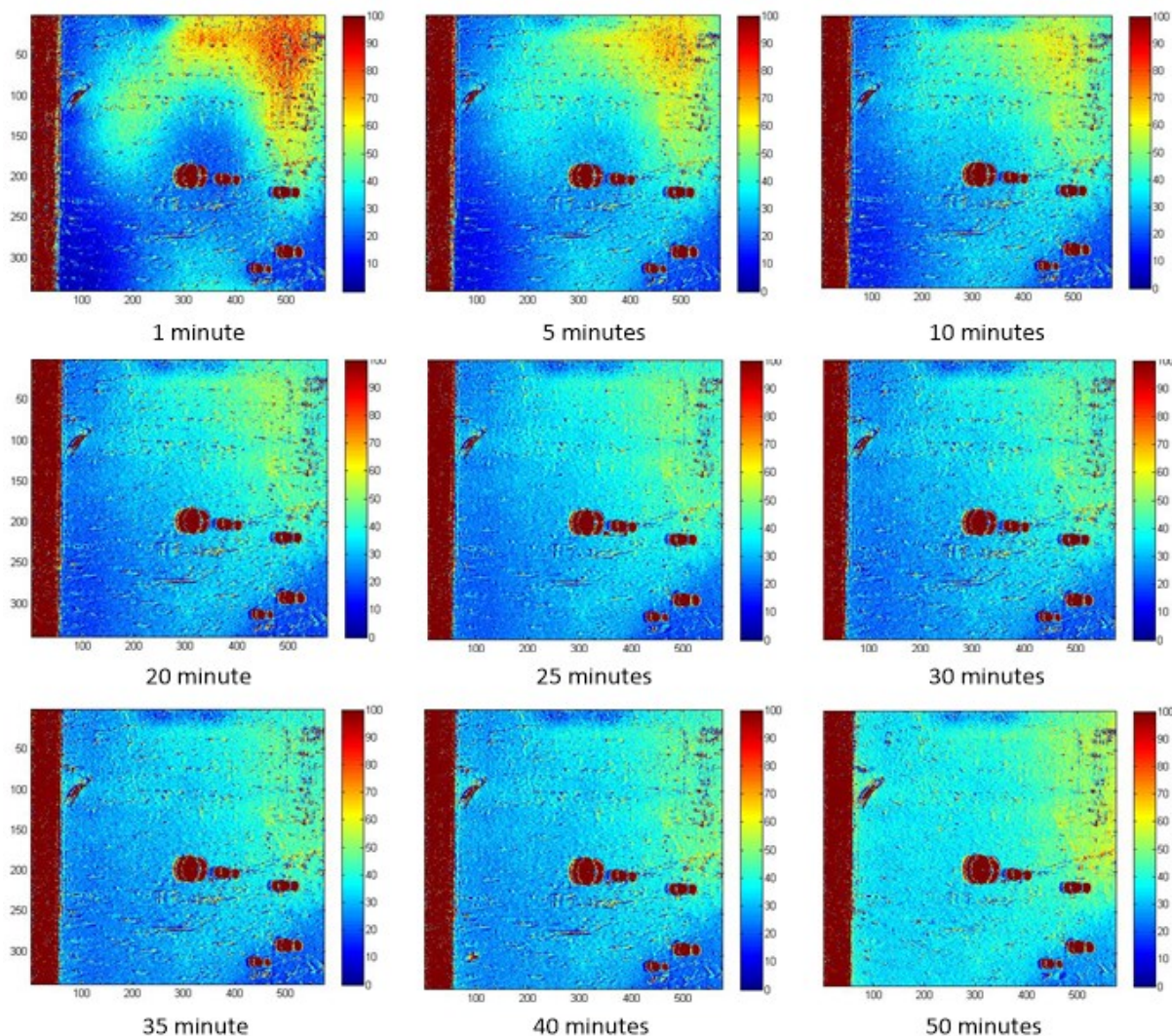


Figure 38. Images SPR de 25 μL d'étalon hémoglobine (5000 nM) séchés sur une lamelle et passés au travers une membrane de nylon. La sonde d'imagerie SPR est fonctionnalisée avec de l'anti-hémoglobine. Les échelles sont en ng/cm^2 .

Les résultats de l'analyse cinétique indiquent que la première hypothèse est fausse. Dès le début de l'analyse (à la première minute), le signal mesuré démontre que le transfert se fait rapidement, et que l'analyte arrive à la surface de façon concentrée dans l'espace. De fait, l'image à la première minute démontre une forte intensité de signal dans le coin supérieur droit, qui serait en fait le centre de la goutte séchée. Cependant, il est possible de voir que le signal a

tendance à s'estomper avec le temps, et donc que la perte de régiosélectivité s'effectue après le transfert et non avant. Effectivement, le centre de l'empreinte de la goutte, qui est d'une couleur orangée après une minute, tend à pâlir vers le jaune et le vert avec le temps, témoignant une plus faible quantité de biomatériau à cet endroit de la surface. À la toute fin de l'analyse, l'entièreté de la surface analysée devient bleu pâle, ce qui indique la présence de matériel, en faible concentration, sur l'étendue de la surface. La deuxième hypothèse, avançant que les protéines se diluent avant le transfert, est donc tout aussi fautive. Ici, la conclusion qui est tirée est qu'aucune adsorption spécifique n'a lieu à la surface de la sonde ; l'hémoglobine ne se lie pas à son anticorps à la surface, et le signal mesuré n'est que non spécifique.

Afin de valider cette conclusion, un test de contrôle aveugle est effectué. Il est donc question ici de fonctionnaliser la surface de la sonde avec un anticorps qui ne reconnaît pas l'analyte, et d'effectuer la même analyse cinétique. Si les signaux obtenus sont semblables, c'est donc dire que les signaux obtenus précédemment découlent strictement de l'adsorption non spécifique. La surface de la sonde d'imagerie SPR est donc fonctionnalisée avec des anticorps d'antigènes prostatiques spécifiques (anti-PSA). Tel que prédit, les signaux obtenus sont très similaires aux signaux précédemment obtenus, tel que démontré à la figure 38.

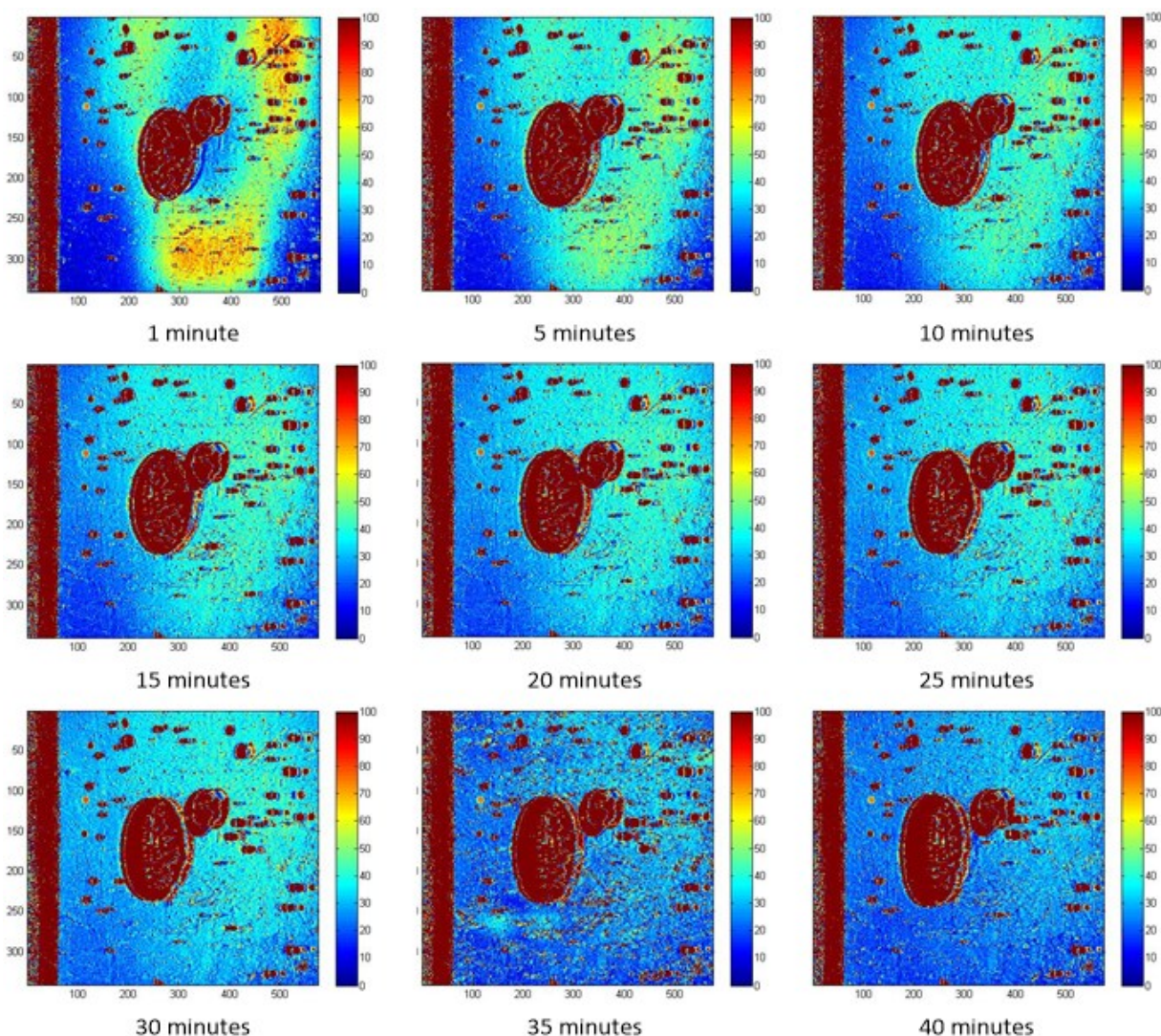


Figure 39. Images SPR de 25 μL d'étalon hémoglobine (5000 nM) séchés sur une lamelle et passés au travers une membrane de nylon. La sonde d'imagerie SPR est fonctionnalisée avec de l'anti-PSA. Les échelles sont en ng/cm^2 .

En effet, ici, même si une bulle obstrue une bonne partie des images obtenues, il est possible de distinguer le même estompement de signal qu'à la figure 38. L'image en début d'analyse, soit après une minute, démontre une forme distincte caractérisée par des endroits où l'intensité de signal est plus forte. Ensuite, l'intensité de signal à ces mêmes endroits semble changer vers le vert et le bleu en fonction du temps, traduisant une perte d'intensité de signal, de façon à perdre la forme observée au départ. Encore une fois, durant l'analyse l'intensité de signal semble s'être diluée sur l'étendue de la surface. De fait, les endroits où il y avait absence quasi complète de signal après une minute d'analyse (principalement dans les coins inférieurs

de la surface) semblent démontrer une augmentation d'intensité, passant d'un bleu foncé à un bleu plus pâle. Vers la fin de l'analyse, la coloration semble se stabiliser sur une teinte de bleu uniforme sur toute la surface, témoignant donc d'une dilution du signal sur l'étendue de la surface.

Face à ces résultats, encore une fois deux hypothèses sont avancées ; que l'hémoglobine se dénature lors du séchage sur la lamelle, et donc la perte de sa structure tertiaire engendre la perte de la reconnaissance par l'anticorps à la surface, ou bien qu'il n'y a aucun transfert de la membrane, et que le résultat vient purement du solvant, qui dans ce cas-ci est le PBS 7,4. Ces hypothèses auraient du sens dans la mesure où un changement d'indice de réfraction (dû aux biomolécules organiques ou au PBS) est bel et bien détecté à la surface de la sonde, mais aucune spécificité n'est atteinte. Évidemment, il y aurait aussi la possibilité que les anticorps à la surface aient totalement perdu leur activité due à la membrane. Afin d'éclairer la question, le prochain test consiste à analyser une lamelle sur laquelle ont séché 25 μ L de PBS à pH 7,4 seulement, qui est en fait la solution dans laquelle sont dissous les analytes depuis le début. Ce test a pour but de voir si les signaux obtenus sont bel et bien attribuables aux protéines (ou aux résidus de leur dénaturation), ou aux sels contenus dans le PBS 7,4. Pour cette analyse, la surface du prisme n'est pas fonctionnalisée (pas même de monocouche auto-assemblée), et donc le PBS migre au travers de la membrane vers la surface d'or qui constitue la sonde SPR. Ceci est pour voir le signal brut du PBS 7,4, afin de le comparer aux résultats obtenus.

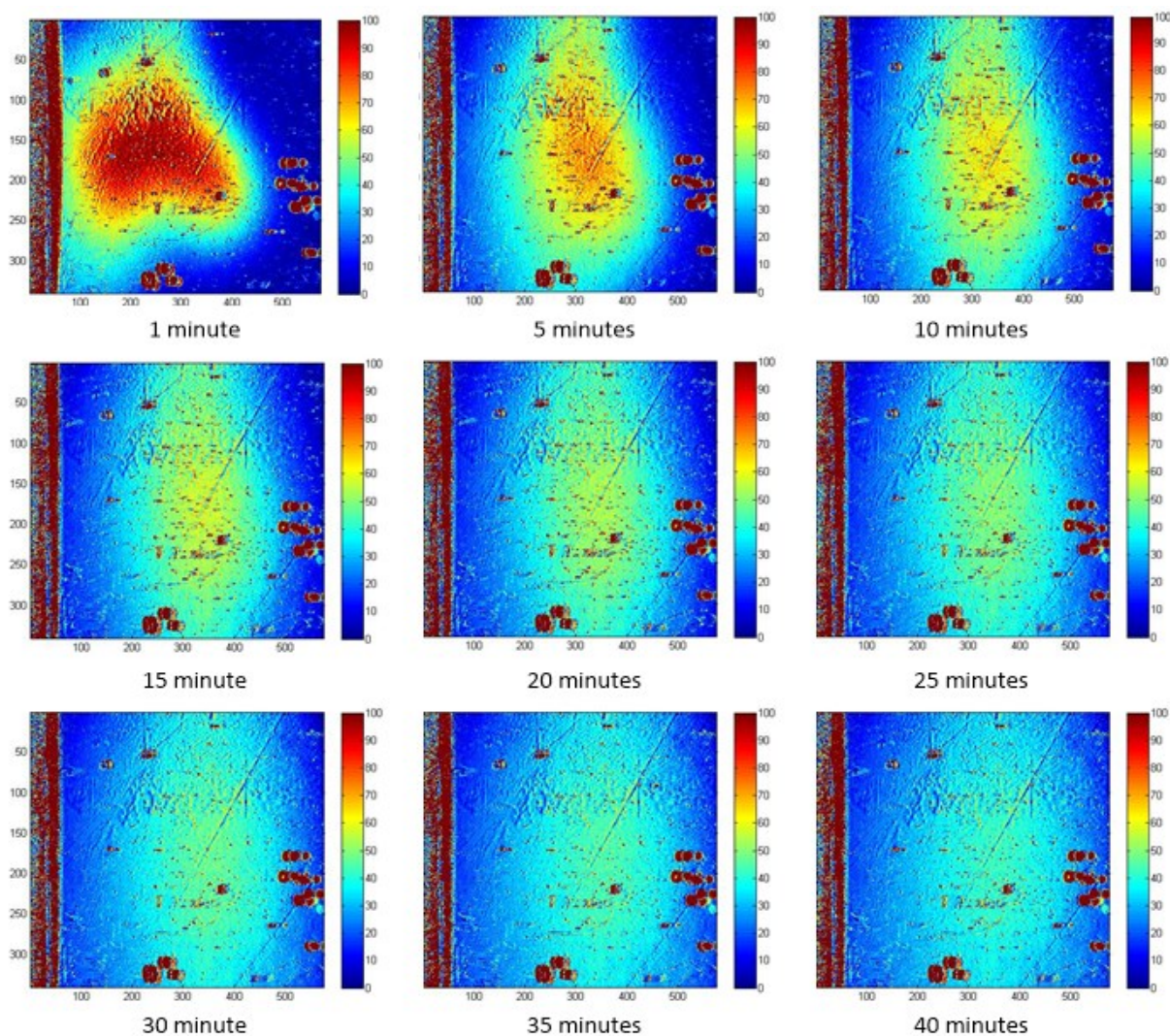


Figure 40. Images SPR de 25 μL de PBS 7,4 séchés sur une lamelle et passés au travers une membrane de nylon. La sonde d'imagerie SPR n'est pas fonctionnalisée. Les échelles sont en ng/cm^2 .

Les résultats obtenus ici sont sans équivoques ; les signaux obtenus aux figures 38 et 39 sont attribuables au PBS 7,4. Effectivement, les mêmes signatures de signal sont observées, et le même estompement est clairement discernable aux images de la figure 40, laissant croire que les biomolécules sont dans l'incapacité de traverser la membrane de nylon, et qu'aucune n'atteint vraiment la surface de la sonde. Ceci vient aussi expliquer pourquoi le signal tend à se diluer sur l'étendue de la surface en fonction du temps ; le PBS séché est concentré à un seul endroit au début de l'analyse, mais s'étend par la suite sur toute la surface étant donné qu'il ne s'adsorbe pas sur celle-ci. La seule conclusion à tirer ici est la suivante : le problème se trouve

clairement au niveau du transfert membranaire. Afin d'investiguer davantage le transfert, les prochains tests sont orientés sur le transfert de masse absolue de biomatériau. Alors, l'idée est de, sans aucune fonctionnalisation de surface, étudier le transfert des biomolécules au travers de la membrane en quantifiant de manière absolue les protéines atteignant la surface. Cependant, travailler avec une surface non-fonctionnalisée implique une différence majeure par rapport aux derniers tests : la surface de la sonde est sèche lorsque la membrane y est déposée. En effet, lorsque la sonde est fonctionnalisée avec des anticorps dans la cellule fluide externe, celle-ci doit rester humectée lors de son transfert vers l'imageur SPR, afin de conserver les anticorps. La membrane, humectée aussi, y est ensuite déposée. Ici, sans fonctionnalisation, la membrane humectée est directement déposée sur la surface d'or sèche. De cette façon, les analyses se rapprochent encore plus des travaux précédents³, et donc il est attendu que le transfert s'effectue avec succès, et que les protéines atteignent la surface de la sonde.

Le but des prochaines analyses est donc de mesurer de façon absolue la masse atteignant la sonde. En faisant sécher un volume connu de solution étalon sur une lamelle, la quantité de masse de départ est connue, et donc on s'attend à mesurer la même masse à la surface de la sonde si le transfert s'effectue à 100%. Trois tests sont donc effectués, avec des étalons d'hémoglobine de 10, 100 et 1000 nM. Pour ces analyses, seulement 5 μ L sont séchés aux surfaces des lamelles pour chacun des étalons, et donc les quantités de biomatériau correspondent respectivement à 3,2, 32 et 320 ng. Sachant que les protéines ont tendance à bien s'adhérer sur l'or en l'absence de monocouche auto-assemblée, il est attendu ici que, si le transfert s'effectue avec succès, les quantités de biomatériau sondées à la surface s'apparentent aux quantités de départ. Encore une fois, les images sont prises à des intervalles de 5 minutes afin de dresser un portrait cinétique du transfert. Une fois de plus, les résultats obtenus portent à croire que le transfert n'obtient aucun succès.

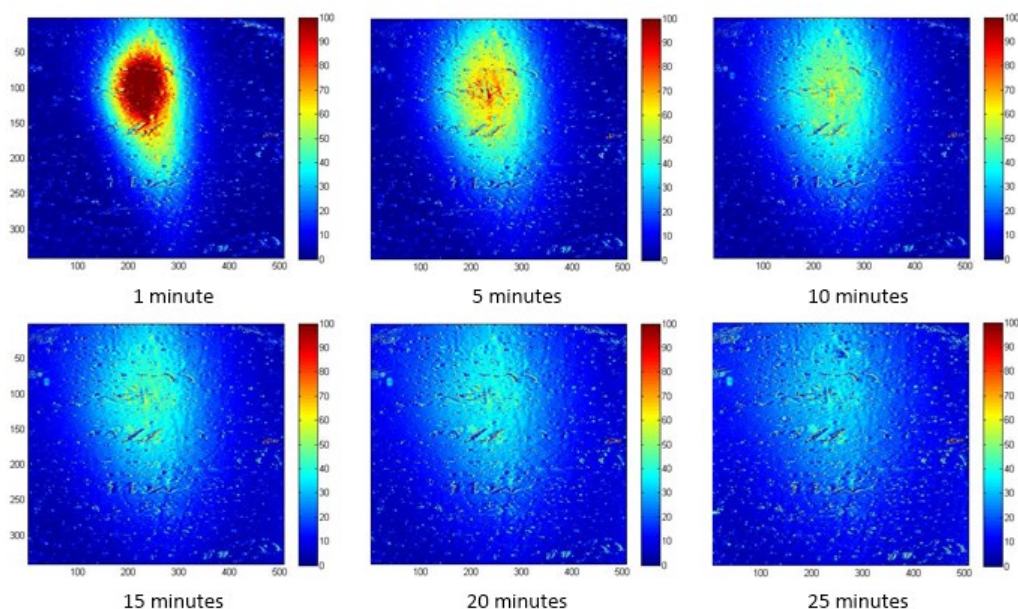


Figure 41. Images SPR de 5 μL d'étalon d'hémoglobine 1000 nM séchés sur une lamelle et passés au travers une membrane de nylon. La sonde d'imagerie SPR n'est pas fonctionnalisée. Les échelles sont en ng/cm^2 .

En effet, on peut voir, à la figure 41, que le même patron est observé, soit un signal local fort obtenu rapidement qui s'amenuise avec le temps. Il est à noter ici que la bande verticale rouge foncé, autrefois observée sur le côté gauche des images, n'est plus. Un traitement de données permet effectivement de soustraire des images obtenues. Donc, à une minute, le signal est fort, concentré et à l'empreinte de la goutte séchée, tandis qu'après 25 minutes, celui-ci est dilué sur toute la surface et semble se dissiper. Pour l'étalon le plus dilué, le même comportement est observé.

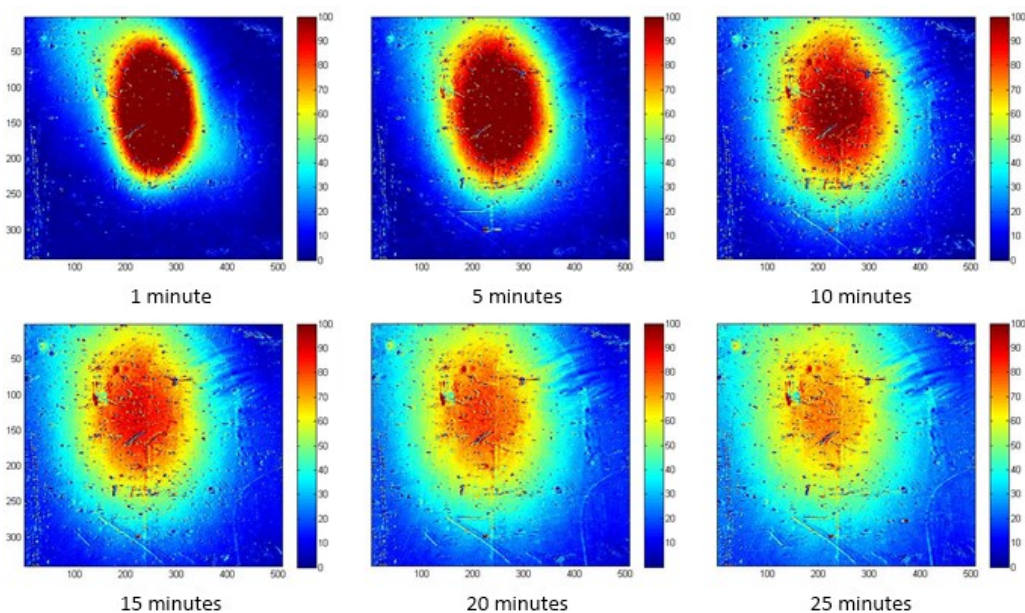


Figure 42. Images SPR de 5 μL d'étalon d'hémoglobine 10 nM séchés sur une lamelle et passés au travers une membrane de nylon. La sonde d'imagerie SPR n'est pas fonctionnalisée. Les échelles sont en ng/cm^2 .

Ici, le signal mesuré semble même plus intense qu'avec l'étalon le plus concentré, et la décroissance temporelle du signal se produit encore une fois. Effectivement, le signal à forte intensité, caractérisé par la coloration rouge foncé, semble plus étendu ici que pour l'étalon le plus concentré à la figure 41. Afin d'y voir plus clair, et de bien quantifier le matériel adsorbé à la surface, les données sont traitées avec une autre approche. De fait, la somme des quantités de matériel mesurées à chaque pixel d'une image est effectuée ; la concentration surfacique est multipliée par la surface d'un pixel, afin d'obtenir de manière absolue la masse de matériel adsorbée à la surface, en nanogramme. Pour ces calculs, les pixels comportant une valeur au-dessus de $200 \text{ ng}/\text{cm}^2$ sont écartés des sommes, afin d'éliminer les fausses mesures occasionnées par les bulles d'air. Ce traitement de données permettra de déterminer si, même s'il y a dilution du signal en fonction de l'espace, le signal total augmente bel et bien en fonction du temps. Les résultats obtenus sont compilés dans le tableau suivant :

Tableau I. Masse totale de matériel à la surface en fonction du temps pour chaque étalon.

Temps (minutes)	Étalon de 10 nM (ng)	Étalon de 100 nM (ng)	Étalon de 1000 nM (ng)
1	18	16	9
5	19	15	9
10	20	14	9
15	21	14	9
20	21	14	9
25	21	-	9

Malheureusement, ici le calcul effectué dans Matlab à partir des données fournit par l'imageur SPR comporte quelque pourcentage s'erreur, et donc les chiffres obtenus sont arrondis à l'unité. Les résultats du tableau I ne sont que très peu concluants. Effectivement, les sommes de matériels mesurés pour les étalons de 1000 nM et 10 nM sont contradictoires : l'étalon le plus dilué fournit le plus de matériel, totalisant 21 ng contre 9 ng pour l'étalon le plus concentré. De plus, la quantité de matériel pour l'étalon le plus dilué semble augmenter le plus en fonction du temps, passant de 18 ng à 21 ng en 25 minutes. Si le transfert s'était effectué convenablement, l'inverse aurait été observé. Les résultats pour l'étalon de 100 nM laissent aussi perplexe : le signal total diminue en fonction du temps, passant de 16 ng à 14 ng. Or, on se serait attendu à une augmentation lente du signal en fonction du temps, dû à l'adhérence de l'hémoglobine sur l'or, suivant une cinétique de l'ordre des travaux précédents.³ De plus, les quantités totales de matériel obtenues à la toute fin des analyses (à 25 minutes), sont du même ordre de grandeur pour les trois étalons (21, 14 et 9 ng), et s'apparentent trop peu à leur quantité de départ respective. Rappelons-le, 320 ng étaient attendus pour l'étalon de 1000 nM, 32 ng pour l'étalon de 100 nM et 3,2 ng pour celui de 10 nM. L'incohérence des résultats permet donc d'émettre l'hypothèse suivante : le signal mesuré pour les trois étalons est en fait le signal du sel présent dans la solution de PBS 7,4 servant à les solubiliser, tel qu'illustré à la figure 40. La conclusion

est donc qu'aucun transfert de protéines n'a lieu, et que celles-ci restent piégées du côté supérieur de la membrane de nylon.

Avant d'aller plus loin, un dernier test est effectué, mais cette fois-ci à l'aide d'une membrane d'une autre composition chimique. Le but ici est de vérifier si la composition chimique de la membrane joue un rôle dans la réussite du transfert. Il a déjà été démontré que la membrane de nylon peut permettre un transfert réussi de protéines^{3, 68}, mais dans ce cas-ci les échecs à répétition obligent l'essai d'une autre membrane. Si les résultats obtenus sont similaires à ceux obtenus jusqu'ici, c'est dire que le problème est autre que la membrane. La membrane utilisée pour cette analyse est donc une membrane de polycarbonate, comportant des pores de 0,4 μm de diamètre. L'étalon, encore une fois séché sur une lamelle, est l'hémoglobine à 1000 nM. L'étalon le plus concentré est utilisé ici afin de favoriser l'obtention de signal. Les résultats obtenus sont homologues aux précédents, tel qu'illustré à la figure 43 :

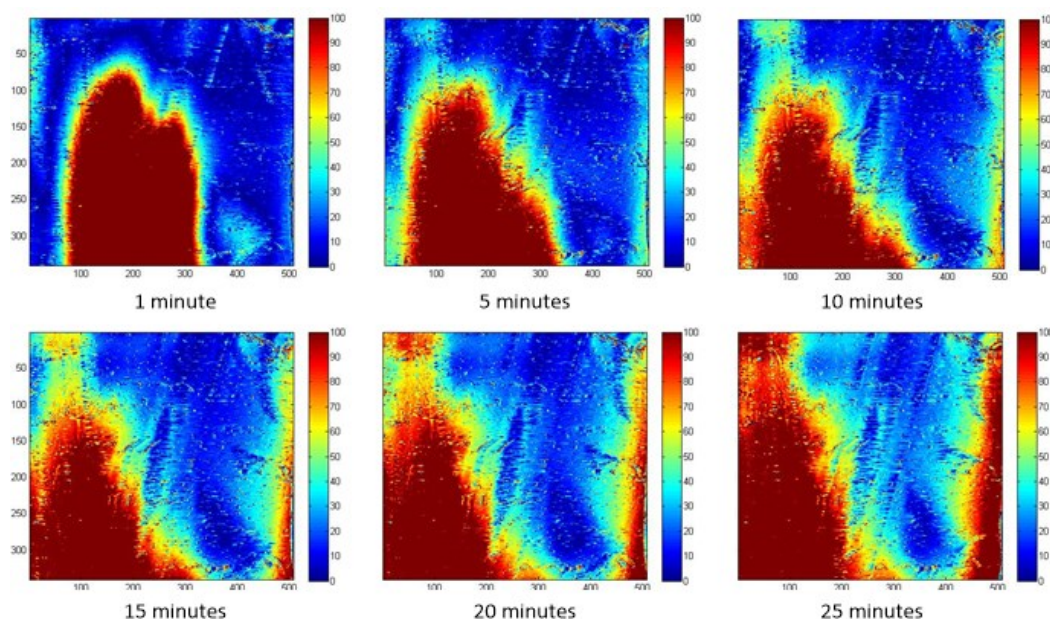


Figure 43. Images SPR de 5 μL d'étalon d'hémoglobine 1000 nM séchés sur une lamelle et passés au travers une membrane de polycarbonate. La sonde d'imagerie SPR n'est pas fonctionnalisée. Les échelles sont en ng/cm^2 .

En effet, ici les résultats ne semblent encore une fois démontrer aucune adsorption à la surface. Cependant, quelques différences sont à noter ici. Au début de l'analyse, l'empreinte de la goutte séchée est clairement apercevable, mais, à défaut de s'estomper tout au long de l'analyse, celle-ci s'accapare le reste de la surface, laissant une diminution de signal à son

emplacement de départ. De plus, la somme des masses mesurées à la surface indique que le signal augmente bel et bien en fonction du temps, tel que le démontre le tableau II. Cependant, le fait que le signal semble changer de place en fonction du temps indique qu'aucune adsorption n'a lieu à la surface. Aussi, la rapidité avec laquelle la forte intensité de signal est obtenue laisse croire que celui-ci n'est aucunement dû aux protéines, sachant que celles-ci diffusent beaucoup plus lentement. Cette observation est aussi valable pour les analyses avec la membrane de nylon.

Tableau II. Masse totale de matériel à la surface en fonction du temps.

Temps (minutes)	Étalon de 1000 nM (ng)
1	18
5	23
10	26
15	28
20	31
25	36

Le tableau II démontre aussi que la masse totale mesurée est encore très loin de la masse déposée au départ, soit 36 ng comparativement à 320 ng. La masse totale obtenue est aussi du même ordre de grandeur que les masses totales obtenues avec la membrane de nylon, suggérant que le transfert échoue encore une fois. La forte intensité et la fluctuation spatiale du signal pourraient être dues à la distance entre la membrane de polycarbonate et la sonde. De fait, la membrane de polycarbonate est beaucoup moins rigide que la membrane de nylon et pourrait parfois même entrer en contact directement avec la sonde, causant une forte intensité de signal.

Il est important de rappeler que les résultats précédents sont le fruit d'une série d'analyses ayant pour la plupart échouées pour des contraintes instrumentales (tel que la présence de bulles sur la sonde). Cette série d'analyses sur le transfert absolu de masse de matériel permet de conclure qu'aucune reproductibilité significative n'est atteignable avec le

montage présent pour ce genre d'analyse. Une autre démarche est donc mise de l'avant pour la suite du projet ; celle de s'approcher le plus possible des conditions expérimentales des travaux précédents, ceux-ci présentant un transfert de protéine réussi avec un même montage. L'idée de cette approche est d'effectuer des images de coupes d'homogénats de foies de souris, dans lesquels est ajouté un analyte à concentration connue. En effet, les signaux obtenus jusqu'à présent portent à croire que les échantillons ne comportent pas assez de biomatériau afin d'initier un transfert. Travailler avec des coupes tissulaires (ou d'homogénat) ferait en sorte d'augmenter considérablement la quantité de biomatériau présent sur les échantillons, et donc pourrait inciter le transfert de protéines à travers la membrane.

3.2.4 Étude de transfert par dépôt d'homogénats de foie

Ici, l'analyte cible ne doit pas être présent dans l'échantillon avant l'ajout, et donc c'est l'immunoglobuline de type G humaine qui est choisie (IgG). L'avantage de travailler dans ces conditions, est que non seulement on vient mimiquer des conditions ayant fait leurs preuves, mais on se rapproche aussi des conditions de l'objectif final. De plus, la chimie entourant l'IgG et l'anti-IgG est bien connue au sein du groupe de recherche. Deux homogénats de foies de souris sont donc préparés, l'un avec l'analyte, à une concentration de 5000 nM, et l'autre sans, tel qu'expliqué au chapitre 2. Voici donc un bref résumé des conditions expérimentales : la surface d'or est fonctionnalisée avec une monocouche auto-assemblée de 3-MPA-LHDLHD, et ensuite avec des anticorps de type anti-IgG. Le reste des sites actifs à la surface est bloqué à l'aide d'éthanolamine. Suite à la fonctionnalisation, une membrane de nylon humectée de formate d'ammonium est déposée à la surface (celle-ci préalablement humectée), et ensuite l'échantillon y est déposé par-dessus. L'échantillon consiste ici en une coupe d'homogénat de 25 μm d'épaisseur, montée sur une lamelle de verre.

Encore une fois, les images sont prises aux 5 minutes, afin d'analyser la cinétique de transfert. Avec de telles conditions, la vitesse de diffusion des protéines à travers de la membrane est estimée autour de 3 $\mu\text{m/s}$.³ Cependant, à ce stade-ci la vitesse de diffusion des protéines à travers la membrane est une considération mineure, sachant que l'objectif en bout de ligne est d'accumuler assez de biomatériau à la surface. Tel que mentionné, deux homogénats sont analysés, l'un enrichi d'IgG et l'autre sans IgG, faisant office de contrôle négatif. Tout

comme au début, le but ici est de mesurer l'apport du signal total de l'échantillon enrichi dû à l'adsorption non spécifique. Pour l'échantillon enrichi, on s'attend donc à avoir un signal de la forme de l'empreinte du tissu, augmentant avec le temps. Pour le contrôle négatif, on s'attend à obtenir la même empreinte de signal, mais de beaucoup plus faible intensité. Les premiers résultats obtenus sont prometteurs, tel que démontré à la figure 44 :

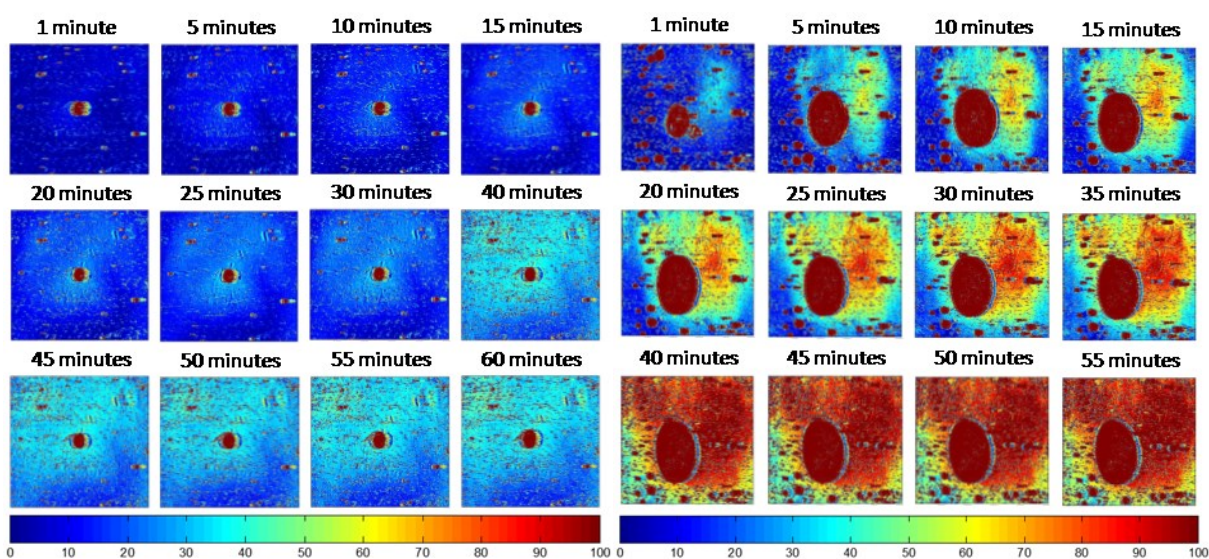


Figure 44. Images SPR d'homogénats de foie passant au travers une membrane de nylon. La surface est fonctionnalisée avec de l'anti-IgG. À gauche : échantillons sans IgG. À droite : échantillon enrichi d'IgG (5000 nM).

Effectivement, malgré la présence de bulles aux deux analyses, des empreintes des coupes d'homogénats sont clairement discernables sur les deux séries d'images. L'analyse avec l'échantillon enrichi témoigne d'une plus forte intensité de signal, et pour les deux analyses, l'empreinte ne s'estompe pas en fonction du temps, mais bien s'intensifie. Ceci est d'autant plus intéressant du côté de l'échantillon enrichi, où il est clairement possible de discerner l'augmentation de signal de la forme de la coupe d'homogénât ; augmentation qui est plus marquée vers le centre de la coupe. De plus, la vitesse à laquelle l'intensité de signal augmente à la sonde est plus réaliste, et représentative du coefficient de diffusion des protéines au travers de la membrane en milieu aqueux. La différence d'intensité de signal entre les deux séries d'images serait donc attribuable directement à la présence d'IgG : on retrouve une adsorption spécifique du côté de l'échantillon enrichi. Il est à noter ici que l'analyse de l'homogénat sans IgG manque une image à 35 minutes, tandis que l'analyse de l'échantillon enrichi manque une

image à 60 minutes. Ces fluctuations sont dues au logiciel accompagnant l'imageur. Celui-ci, n'étant aucunement conçu pour effectuer des analyses de la sorte, a tendance à mal fonctionner lorsque surutilisé, et, le cas échéant, un redémarrage du système est nécessaire. C'est donc pourquoi certaines images à certains temps sont manquantes. Ceci s'ajoute aux contraintes instrumentales du montage.

Afin de mieux comparer les deux résultats obtenus, la somme des masses mesurées à chaque pixel de chaque image est encore une fois effectuée. Les sommes obtenues sont ensuite étudiées en fonction du temps, dans le graphique ci-dessous :

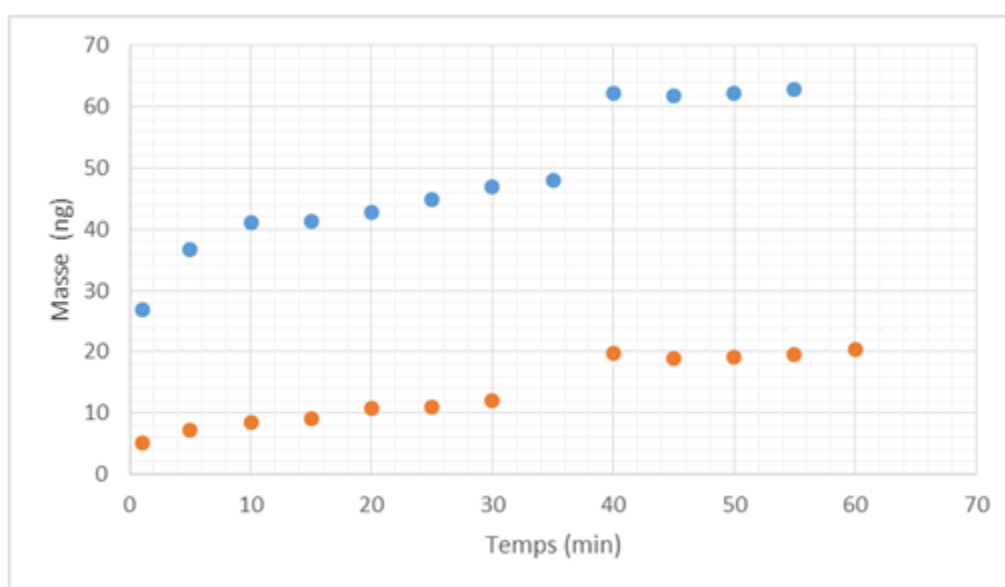


Figure 45. Masse absolue mesurée à chaque image SPR en fonction du temps. La série bleue représente l'échantillon enrichi avec l'IgG, et la série orange représente l'échantillon sans IgG.

La figure 45 démontre bien l'augmentation du signal en fonction du temps pour les deux séries d'analyses. Tel qu'attendu, les courbes d'adsorption du matériel à la surface suivent une isotherme de Langmuir; une augmentation marquée du signal en peu de temps en début d'analyse, suivie par l'obtention d'un plateau. Sauf quelques fluctuations autour de 30 minutes, les courbes obtenues se rapprochent beaucoup des courbes attendues. La série orange serait donc attribuée à l'adsorption non spécifique, et pourrait être soustraite aux masses de la série bleue. La courbe résultante d'une telle soustraction représenterait la masse (et donc le signal) directement attribuable à l'IgG présent dans l'homogénat enrichi. D'emblée, ce résultat marque

un point tournant au sein des travaux de ce mémoire. En effet, il y a ici un transfert réussi de protéines à travers une membrane, ainsi qu'une adsorption spécifique sur une sonde d'imagerie SPR permettant une quantification spécifique et régiosélective. Afin de confirmer la véracité des résultats obtenus, d'autres analyses similaires sont effectuées pour s'assurer de la reproductibilité de la méthode. Si celle-ci s'avère reproductible, la prochaine étape du projet pourrait être enclenchée, soit le couplage avec l'imagerie MS (MALDI-iMS), et l'analyse de protéines cibles directement dans des coupes tissulaires.

Alors, exactement de la même façon que précédemment, une deuxième et troisième analyse sont effectuées selon la méthode développée. Malheureusement, les résultats obtenus à partir de ce point témoignent d'une reproductibilité très faible.

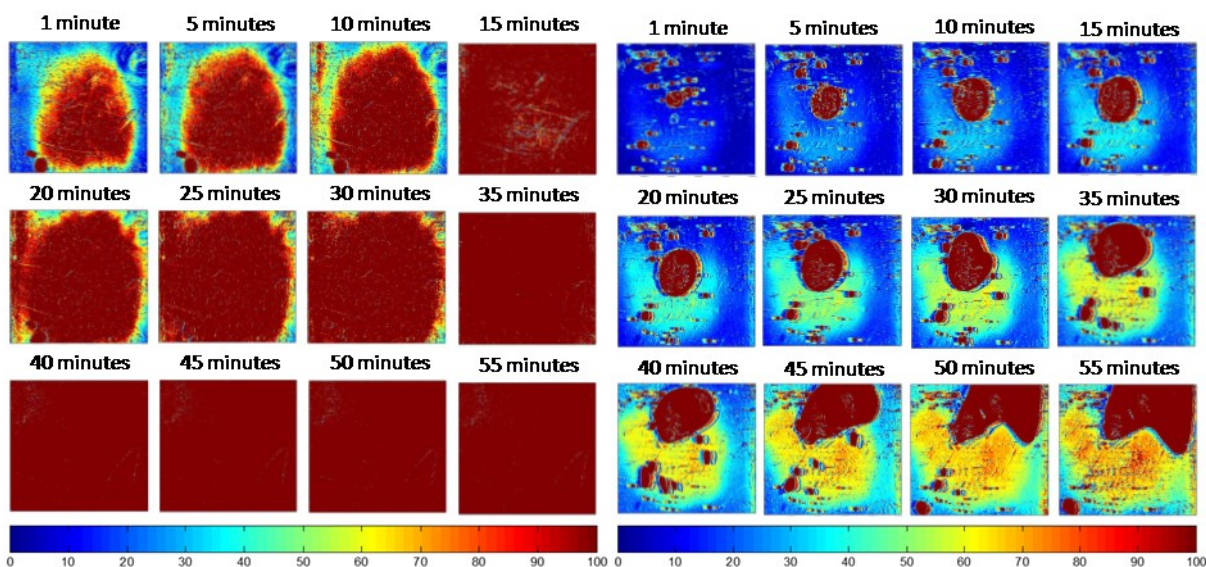


Figure 46. Deuxième analyse : Images SPR d'homogénats de foie passant au travers une membrane de nylon. La surface est fonctionnalisée avec de l'anti-IgG. À gauche : échantillons sans IgG. À droite : échantillon enrichi d'IgG (5000 nM).

Ici, la figure 46 démontre complètement l'inverse des résultats préalablement obtenus à la figure 44. Effectivement, l'échantillon enrichi fournit significativement moins de signal que l'échantillon non enrichi. Du côté de l'échantillon enrichi, une empreinte est observable, malgré la présence de bulles à la surface du capteur. De plus, le signal mesuré en fonction du temps semble s'apparenter au signal obtenu à la première analyse d'échantillon enrichi. De prime abord, ce résultat devrait être encourageant. Cependant, il en est tout autre du côté de

l'échantillon non enrichi, ou il semble y avoir un transfert très rapide de la coupe à la sonde, jusqu'à saturation de celle-ci. Encore une fois, afin de bien comparer les résultats, les sommes de masses obtenues sont étudiées en fonction du temps.

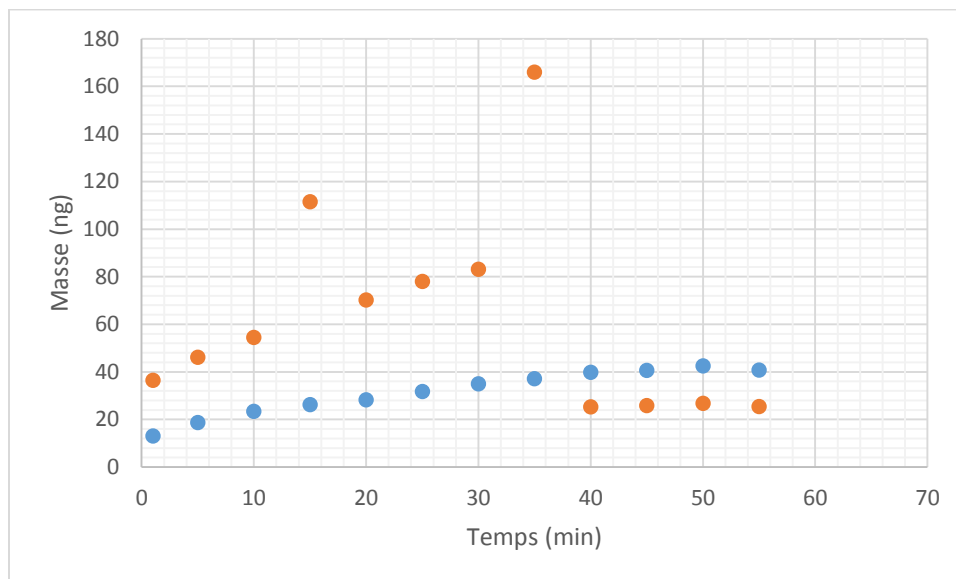


Figure 47. Deuxième analyse : Masse absolue mesurée à chaque image SPR en fonction du temps. La série bleue représente l'échantillon enrichi avec l'IgG, et la série orange représente l'échantillon sans IgG.

La figure 47 démontre, pour les deux séries, une faible augmentation de signal en fonction du temps. La série enrichie semble atteindre un plateau après une maigre augmentation, tandis que la série non enrichie fluctue beaucoup, et diminue drastiquement vers 35 minutes avant d'atteindre son plateau. Ces fluctuations seraient dues à la saturation de la sonde, alors que la diminution serait due au calcul de somme : les pixels atteignant un certain signal sont écartés du calcul afin d'éliminer les bulles. Deçà, la fonctionnalisation de la surface lors de l'analyse de l'échantillon non enrichi est soupçonnée d'avoir plus ou moins fonctionné, et donc a échoué à rendre la sonde spécifique à l'analyte. Pourtant, la méthode de fonctionnalisation des prismes a depuis longtemps fait ses preuves, et donc une mauvaise fonctionnalisation est beaucoup moins susceptible de se produire. Mais, étant donné que chaque analyse (chaque série d'images) comporte sa propre sonde, et donc sa propre fonctionnalisation, un problème a pu s'être glissé dans l'une d'entre elles. La cellule fluidique externe ne comportant aucune composante optique, le suivi de la fonctionnalisation est impossible et donc une erreur ne peut être discernée avant l'analyse SPR. Une troisième analyse est donc effectuée, suivant la même

méthode que les deux dernières, afin d'y voir un peu plus clair. Les résultats obtenus pour cette analyse sont présentés à la figure 48.

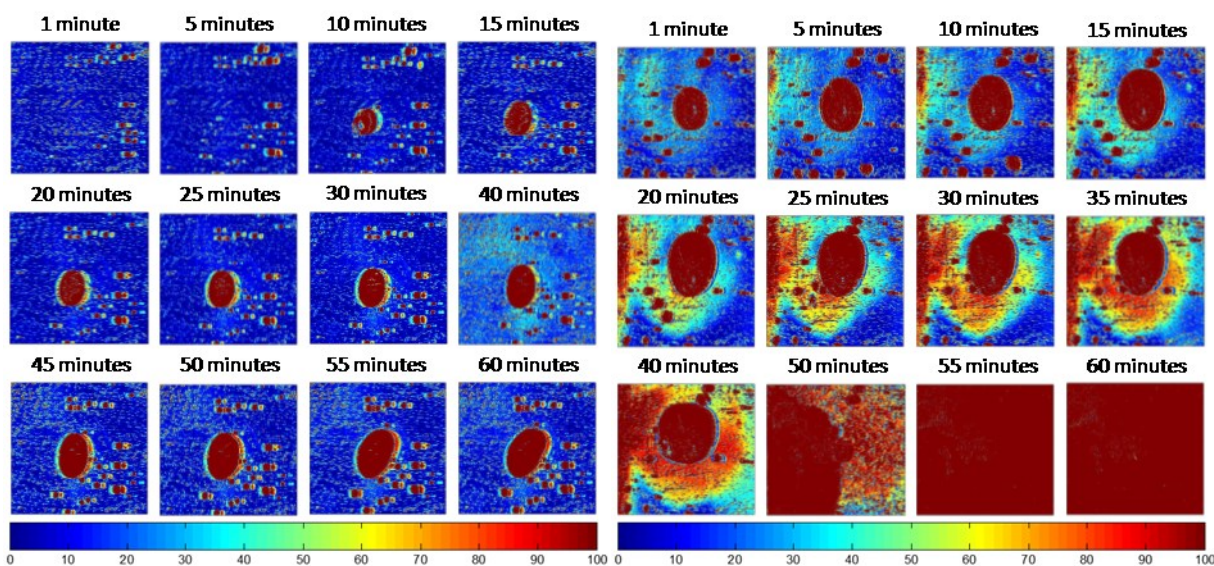


Figure 48. Troisième analyse : Images SPR d'homogénats de foie passant au travers une membrane de nylon. La surface est fonctionnalisée avec de l'anti-IgG. À gauche : échantillons sans IgG. À droite : échantillon enrichi d'IgG (5000 nM).

Encore une fois, il est impossible de se départir des bulles lors de ces analyses. Les échantillons étant déposés à la main et à l'aide de longues pinces dans une cellule ouverte d'à peine un centimètre carré, situé sur le dessus de l'appareil, il est très difficile d'éviter l'introduction de bulles d'une analyse à l'autre. Toutefois, les résultats obtenus sont un peu plus encourageants qu'à la deuxième analyse ; déjà il y a moins de signal du côté de l'échantillon non enrichi. De fait, l'analyse de la coupe sans IgG ne démontre presque qu'aucun signal, voir l'ombre d'une empreinte à l'image de 40 minutes, caractérisée par des teintes de bleue plus pâle, qui semble s'atténuer jusqu'à 60 minutes. Ceci laisse croire que la fonctionnalisation a ici réussi, et que la surface est bel et bien spécifique à l'IgG seulement. Pour l'échantillon enrichi, une empreinte est percevable malgré la bulle, et le signal semble augmenter en fonction du temps tel qu'attendu. Cependant, l'image obtenue à 50 minutes dévoile une information considérable. En effet, l'intensité du signal obtenu aux images de 55 et 60 minutes pourrait laisser croire qu'il y a saturation de la sonde après 55 minutes ; mais l'image de 50 minutes pointe vers une tout autre conclusion. De fait, on peut voir à l'image de 50 minutes que la saturation semble davantage à un agrandissement de la bulle, due au démarquage net de la saturation avec le reste

de l'image, démarquage ayant drôlement les mêmes courbes que la bulle sur l'image précédente. Ceci indique donc que la sonde n'est pas saturée, mais bien qu'elle sèche après un certain temps, rendant impossible toute analyse. Cette nouvelle information est donc porteuse de questionnement ; la saturation de signal obtenue à la deuxième analyse (figure 46 à gauche) est-elle vraiment due à une saturation de la sonde ? Ou bien celle-ci n'est due qu'au séchage de la sonde après 35 minutes ? Les sommes de masses obtenues sont étudiées en fonction du temps encore une fois :

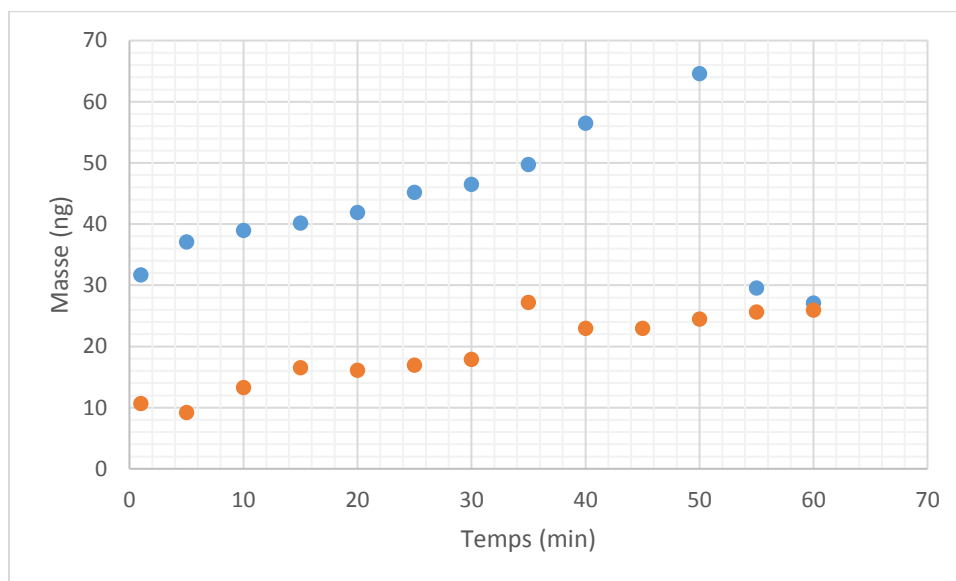


Figure 49. Troisième analyse : Masse absolue mesurée à chaque image SPR en fonction du temps. La série bleue représente l'échantillon enrichi avec l'IgG, et la série orange représente l'échantillon sans IgG.

La figure 49 semble s'apparenter aux résultats de la première analyse, et les masses obtenues pour les deux séries sont semblables aux deux séries de la première analyse. Ce résultat encore une fois est encourageant, mais la baisse du signal vers la fin de l'analyse vient souligner le problème de séchage dans la cellule fluïdique. Une quatrième analyse est donc effectuée, afin d'apporter le plus d'informations possible à la situation. En effet, les contraintes instrumentales entraînent la présence d'une multitude de variables durant les analyses, et donc plusieurs analyses sont nécessaires afin d'avoir un meilleur portrait de la situation. La même méthode est donc mise de l'avant, édifiant les figures suivantes.

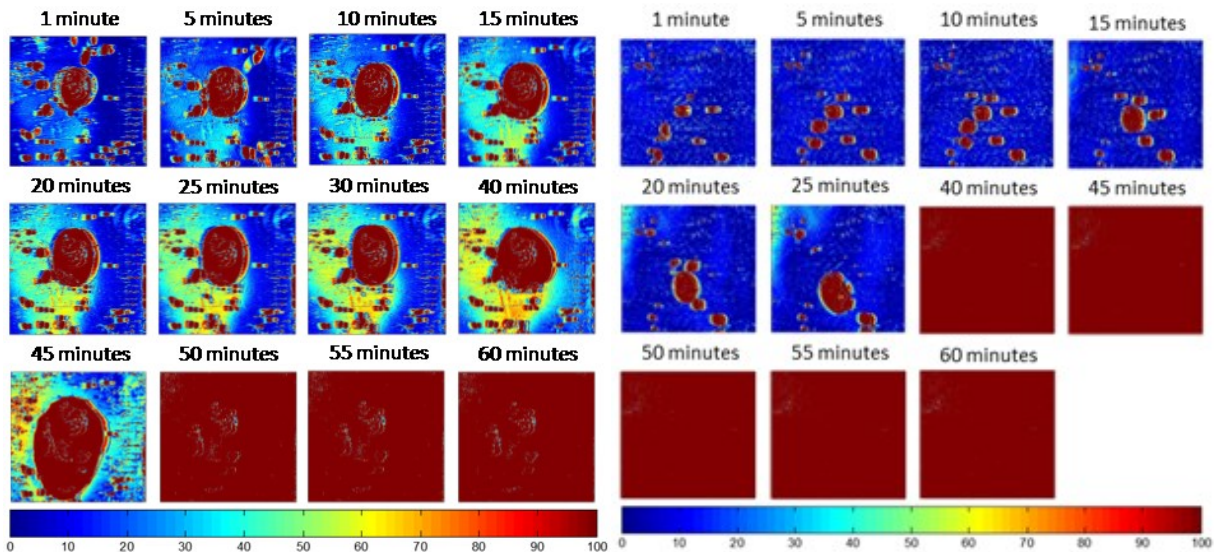


Figure 50. Quatrième analyse : Images SPR d'homogénats de foie passant au travers une membrane de nylon. La surface est fonctionnalisée avec de l'anti-IgG. À gauche : échantillons sans IgG. À droite : échantillon enrichi d'IgG (5000 nM).

Une fois de plus, les bulles et le mal fonctionnement du logiciel viennent empêcher l'obtention d'une analyse complète. Néanmoins, il est possible de conclure que les résultats obtenus démontrent l'inverse de ce qui est escompté; le signal obtenu du côté de l'échantillon sans IgG est plus intense que du côté de l'échantillon enrichi. De plus, la forme de la coupe est seulement distinguable lors de l'analyse de l'échantillon blanc. L'absence presque totale de signal du côté enrichi est déconcertante, laissant croire qu'aucun transfert de protéine ne s'effectue au travers de la membrane. Ensuite, toujours du côté enrichi, l'augmentation abrupte de signal à 40 minutes vient corroborer l'hypothèse émise précédemment, émettant que la surface de la sonde s'assèche autour des 30 minutes. Il est impossible ici de savoir à quel moment la sonde a séché, étant donné l'impossibilité d'acquérir des images entre 20 et 40 minutes. Une chose est sûre : le séchage a un impact considérable sur le transfert et l'analyse. En effet, le niveau de mouillage de la membrane comporte un aspect capital, à savoir que les distances membrane/surface et membrane/tissu en dépendent. Plus le taux de mouillage est élevé, plus la couche de solvation est forte autour de la membrane, faisant en sorte que celle-ci baigne quelque peu entre la lamelle et la surface lors du transfert (la surface étant déjà humectée du à la fonctionnalisation). Un faible taux de mouillage entraine un espace restreint dans lequel baigne la membrane, ce qui vient impacter considérablement le transfert des

protéines, jusqu'à l'anéantir complètement lors du séchage total. Malgré tout, les sommes de masses obtenues sont étudiées en fonction du temps :

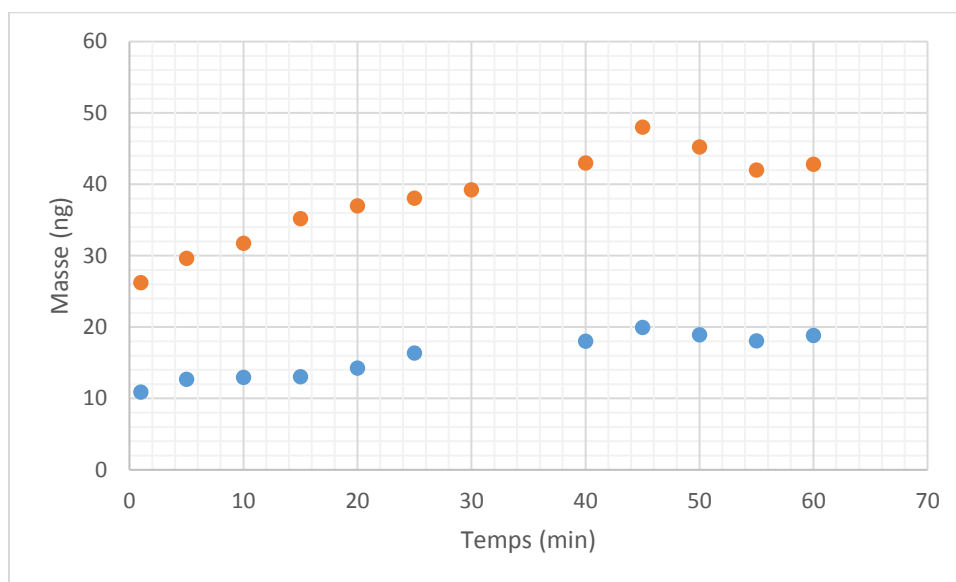


Figure 51. Quatrième analyse : Masse absolue mesurée à chaque image SPR en fonction du temps. La série bleue représente l'échantillon enrichi avec l'IgG, et la série orange représente l'échantillon sans IgG.

Les courbes obtenues démontrent encore une fois la non reproductibilité des résultats de la quatrième analyse; un plus faible signal est obtenu pour un échantillon enrichi d'IgG, sur une surface pourtant spécifique à l'IgG. De plus, pour l'échantillon dosé, la quantité de matériel est faible relativement aux autres analyses, et ce même avant le séchage de la surface, ce qui permet d'avancer que le transfert fut un échec lors de cette analyse.

Face aux différences importantes obtenues à chacune des quatre analyses, nous sommes contraints de retourner à la planche à dessin afin de réanalyser tous les résultats et d'élaborer une autre approche. Quatre analyses semblent peu, mais il faut rappeler que ces quatre analyses présentées sont encore une fois le fruit d'un nombre considérable d'analyses s'échelonnant sur plusieurs mois, la plupart ayant échoué avant même de pouvoir fournir des résultats, bons ou mauvais. Une autre approche se doit de considérer une amélioration du montage expérimental, celui-ci comportant présentement beaucoup trop de contraintes et de variables instrumentales sur lesquelles il est impossible d'avoir un quelconque contrôle. En effet, les bulles dans le montage, le logiciel défaillant, le temps variant de séchage de la membrane en cellule ouverte,

les distances membrane/surface et membrane/tissu, la fonctionnalisation de la sonde sans suivi, le niveau de mouillage de la sonde entre la fonctionnalisation et la prise d'images en SPR, et le dépôt de lamelle à main, représentent toutes des contraintes auxquelles l'expérimentateur doit faire face afin d'obtenir une analyse viable (pour ne nommer que celles-ci). D'autant plus que l'instrument et le logiciel présentement utilisés ne sont aucunement conçus pour effectuer les analyses demandées, et donc aucun support du fournisseur n'est possible. De prime abord, l'amélioration du montage par l'automatisation du dépôt de l'échantillon éliminerait déjà une bonne partie des fluctuations entre les analyses. De fait, le dépôt à la main des lamelles représente, selon moi, le plus gros défi des analyses. Le moindre mouvement se voit directement sur les images, rendant certaines complètement inutilisables, gâchant du même coup toutes les étapes préalables et nécessaires à l'obtention d'images de qualité. Les lamelles de 9 mm par 9 mm, manipulées au bout de longues pinces, doivent être insérées dans une cavité à peine plus grande qu'elles avec une précision extrême sans quoi l'expérience dans son ensemble est à refaire.

Somme toute, les quelques résultats encourageants obtenus, en plus des travaux effectués précédemment par Simon Forest, démontrent que le concept est bel et bien viable, et qu'il est possible d'obtenir des images quantitative, régiosélective et spécifique à un analyte cible à l'aide de l'imagerie SPR. La reproductibilité n'est cependant pas encore atteinte dû à de trop nombreuses contraintes expérimentales entourant le présent montage. Donc, afin d'élaborer une autre approche et d'améliorer les résultats obtenus, il est nécessaire de réduire le plus possible les contraintes en s'attaquant à celles ayant le plus d'impact. Après la main de l'expérimentateur, la variable ayant le plus d'impact sur les analyses est le séchage de la membrane, et par le fait même les distances membrane/surface et membrane/tissu. En effet, les résultats obtenus précédemment portent à croire que le taux de mouillage de la membrane joue un rôle clé sur le transfert, et n'est jamais constant d'une analyse à l'autre. Malheureusement, par manque de temps, les prochaines analyses à ce sujet devront être abordées lors de travaux futurs, dans un prochain mémoire. Toutes ces contraintes instrumentales, ayant mené à toutes ces analyses infructueuses, ont eu raison du délai alloué dans le cadre d'un seul mémoire. Différentes perspectives sont toutefois proposées en conclusion, pour quiconque désirant d'aventurer sur ce projet de recherche.

Chapitre 4 Conclusion

En conclusion, l'objectif poursuivi dans ce mémoire, qui était de développer une méthode reproductible d'imagerie SPR permettant d'obtenir des images quantitatives et régiosélectives de protéines cibles dans de minces coupes tissulaires, n'a pas été atteint. Les travaux effectués dans ce mémoire, divisés en deux catégories, n'ont pas démontré une reproductibilité suffisante pour l'obtention d'une méthode viable. La première partie, portant sur la fonctionnalisation d'une sonde à imagerie SPR avec des anticorps, a toutefois été réalisée avec succès. En effet, les travaux effectués ont établi qu'il est possible, à l'aide de concepts de chimie de surface, de fonctionnaliser la surface d'un prisme d'imagerie SPR à l'intérieur d'une fluide indépendante à l'imageur, et ce, sans affecter l'activité des anticorps. La méthode de préparation des sondes d'imagerie, préalablement à la prise d'images SPR de protéines cibles, s'avère donc une réussite, et représente la base à suivre pour les travaux futurs de ce projet.

La deuxième partie par contre, concernant le transfert de protéines d'un tissu biologique jusqu'à la surface de la sonde, n'a pu être effectuée avec succès. Effectivement, même si quelques résultats semblent pointer vers la possibilité qu'un transfert s'effectue bel et bien avec brio, la piètre reproductibilité des résultats, bons ou mauvais, empêche de tirer une conclusion claire et positive. Cette étape de la méthode représente le nerf du projet, comme quoi sans contrôle adéquat du transfert, aucune image SPR viable n'est atteignable. Les multiples tentatives infructueuses présentées dans ce mémoire, et ce malgré plusieurs approches différentes, imposent la conclusion suivante : la méthode de transfert de protéine, d'une coupe tissulaire jusqu'à une sonde d'imagerie SPR fonctionnalisée spécifiquement reste jusqu'à présent techniquement très difficile et peu reproductible.

Finalement, les multiples contraintes instrumentales mises en lumière durant les travaux de ce mémoire démontrent une déficience flagrante dans le design actuel du montage. L'introduction d'échantillons dans l'imageur SPR représente l'aspect le plus critique, affecte de façon considérable la qualité des analyses et ruine toute reproductibilité. L'automatisation de cette étape procurerait un contrôle beaucoup plus adéquat, et augmenterait le taux de réussite des analyses. L'incorporation d'une autre composante instrumentale, telle qu'un système d'approche d'échantillon, devrait être envisagée pour les travaux futurs.

4.1 Perspectives

Tel que mentionné plus haut en conclusion, les travaux de ce mémoire, malgré l'échec d'atteindre l'objectif initial, ouvrent les bases sur plusieurs approches à considérer pour la suite des travaux. L'objectif ultime du projet, qui serait de coupler cette méthode à une méthode d'imagerie par spectrométrie de masse, apporterait une technique puissante dans le domaine bioanalytique, et même de diagnostic médical. En effet, une telle technique révolutionnerait le domaine de l'immunohistologie, et permettrait de cartographier certaines protéines cibles au sein de tissus biologiques. En adaptant la technique, il serait possible de détecter ou de suivre la concentration de biomarqueur cible en fonction de leur emplacement au sein de coupes tissulaires, fournissant des informations cruciales à la compréhension de diverses pathologies. Ce projet mérite donc l'intérêt de la recherche et devrait, selon moi, être poursuivi. D'autant plus qu'à preuve du contraire, aucun groupe de recherche au monde ne travaille sur le développement d'une telle technique (couplage des méthodes d'imagerie SPR et MALDI-MS pour l'analyse de coupe tissulaire).

D'abord, la première chose à considérer pour de futurs travaux serait de réadapter le montage instrumental. Non seulement l'automatisation de l'introduction de l'échantillon dans l'imageur, mais aussi son logiciel de pilotage. Ce logiciel, Lab view 4.1 d'Horiba, n'est aucunement adapté pour les analyses effectuées présentement, limitant la prise d'images aux 5 minutes, en plus de mal fonctionner régulièrement (nécessitant le redémarrage complet du système). Un logiciel plus adapté permettrait une meilleure étude cinétique des phénomènes de transfert et d'adsorption, et donc aiderait à obtenir une meilleure compréhension au niveau des paramètres à optimiser, et de quelle façon ceux-ci devraient être optimisés. Certains résultats obtenus dans ce mémoire laissent suggérer qu'avec un logiciel adéquat et un système d'approche d'échantillon automatisé, des résultats encore plus significatifs sont à portée de main.

Ensuite, les autres paramètres semblant avoir le plus d'impact sur les résultats sont les distances membrane/surface et membrane/tissu. Effectivement, l'absence de contrôle sur ces distances représente une limitation considérable, et donc la membrane de nylon semble toujours baigner librement entre la lamelle de verre et la surface du prisme, affectant le transfert de protéine. Afin de rendre ces distances constantes, une approche proposée est d'utiliser une

surface de nanostructures plasmoniques, telles que des nanopiliers ou des nanotrous, en remplacement de la surface d'or plane. Ce genre de nanostructure a été largement étudié au sein du groupe de recherche du professeur Masson^{25, 69, 70}, et leurs protocoles de formation sont bien maîtrisés. Des nanopiliers, parsemés de façon périodique sur la surface, feraient office de support pour la membrane. Une fois l'échantillon déposé sur la membrane, une pression verticale pourrait y être appliquée, afin de pousser l'échantillon sur la membrane, qui s'accoterait sur les piliers, ceux-ci d'une hauteur autour de 700 nm. Avec une pression constante à chaque analyse, la distance membrane/tissu deviendrait constante, et la distance membrane surface serait en fait la hauteur des piliers.

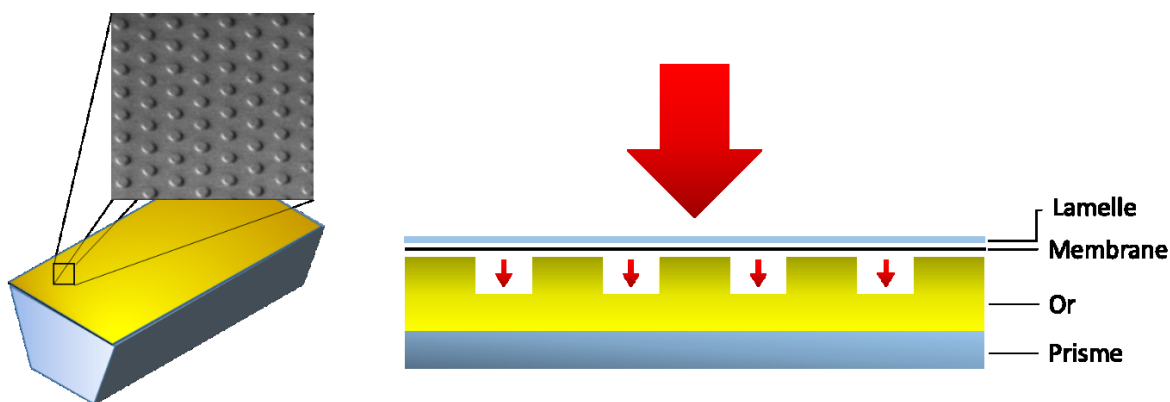


Figure 52. Représentation de nanopiliers d'or sur une surface de prisme d'imagerie SPR. À gauche, disposition périodique des piliers sur la surface (cette figure n'est pas à l'échelle). À droite, déposition d'échantillon sur un prisme comportant des nanopiliers.

Le côté droit de la figure 52 représente bien l'idée ; la pression appliquée sur la lamelle pourrait provenir d'un poids constant, et donc la lamelle se déposerait sur la membrane, qui se déposerait à son tour directement sur les piliers, ceux-ci faisant office de support physique. Le signal mesuré en imagerie SPR proviendrait de l'adsorption des protéines sur la surface au pied des piliers (avec une telle hauteur de piliers, le signal plasmonique proviendrait seulement de la surface et non des piliers). Une telle approche nécessite beaucoup d'optimisation, car beaucoup de paramètres sont ajoutés tels que le diamètre des piliers, leur hauteur, leur degré de périodicité, et l'intensité de la pression appliquée. Par contre, l'optimisation de tous ces paramètres permettrait de garder des distances membrane/tissu et membrane/surface constantes non seulement tout au long de l'analyse, mais aussi d'une analyse à l'autre.

L'ultime objectif d'une telle technique, une fois le transfert de protéine optimisé, ainsi que le couplage avec l'imagerie par MS effectué, serait de l'implanter dans les hôpitaux et les cliniques. Une technique permettant l'obtention rapide d'images quantitatives et régiosélectives de protéines cibles au sein de biopsies offrirait aux professionnels de la santé un outil sans précédent pour l'analyse objective de pathologies, ou pour l'obtention de diagnostic précis.

Bibliographie

1. Paul, S.; Vadgama, P.; Ray, A. K., Surface plasmon resonance imaging for biosensing. *Nanobiotechnology, IET* **2009**, 3 (3), 71-80.
2. Abadian, P. N.; Goluch, E. D., Surface plasmon resonance imaging (SPRi) for multiplexed evaluation of bacterial adhesion onto surface coatings. *Analytical Methods* **2015**, 7 (1), 115-122.
3. Forest, S.; Breault-Turcot, J.; Chaurand, P.; Masson, J.-F., Surface Plasmon Resonance Imaging-MALDI-TOF Imaging Mass Spectrometry of Thin Tissue Sections. *Analytical Chemistry* **2016**, 88 (4), 2072-2079.
4. Freestone, I.; Meeks, N.; Sax, M.; Higgitt, C., The Lycurgus Cup — A Roman nanotechnology. *Gold Bulletin* **2007**, 40 (4), 270-277.
5. Wood, R. W., On a Remarkable Case of Uneven Distribution of Light in a Diffraction Grating Spectrum. *Philos. Mag. Series 6* **1902**, 4 (21), 396-402.
6. Otto, A., Excitation of nonradiative surface plasma waves in silver by method of frustrated total reflection. *Zeitschrift Fur Physik* **1968**, 216 (4), 398-410.
7. Kretschm.E; Raether, H., Radiative decay of non radiative surface plasmons excited by light. *Zeitschrift Fur Naturforschung Part a-Astrophysik Physik Und Physikalische Chemie* **1968**, A 23 (12), 2135-&.
8. Liedberg, B.; Nylander, C.; Lundstrom, I., Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing. *Sensors and Actuators* **1983**, 4 (2), 299-304.
9. Yeatman, E.; Ash, E. A., Surface plasmon microscopy. *Electron. Lett.* **1987**, 23 (20), 1091-1092.

10. Rothenhausler, B.; Knoll, W., Surface plasmon microscopy. *Nature* **1988**, 332 (6165), 615-617.
11. Jordan, C. E.; Corn, R. M., Surface plasmon resonance imaging measurements of electrostatic biopolymer adsorption onto chemically modified gold surfaces. *Anal. Chem.* **1997**, 69 (7), 1449-1456.
12. Jordan, C. E.; Frutos, A. G.; Thiel, A. J.; Corn, R. M., Surface plasmon resonance imaging measurements of DNA hybridization adsorption and streptavidin/DNA multilayer formation at chemically modified gold surfaces. *Anal. Chem.* **1997**, 69 (24), 4939-4947.
13. Thiel, A. J.; Frutos, A. G.; Jordan, C. E.; Corn, R. M.; Smith, L. M., In situ surface plasmon resonance imaging detection of DNA hybridization to oligonucleotide arrays on gold surfaces. *Anal. Chem.* **1997**, 69 (24), 4948-4956.
14. Havard, T. Application des liquides ioniques polymériques à empreinte moléculaire pour la résonance de plasmons de surface. Université de Montréal, 2016.
15. Schasfoort, R. B. M.; Tudos, A. J., *Handbook of Surface Plasmon Resonance*. Royal Society of Chemistry: 2008.
16. Zayats, A. V.; Smolyaninov, II; Maradudin, A. A., Nano-optics of surface plasmon polaritons. *Phys. Rep.-Rev. Sec. Phys. Lett.* **2005**, 408 (3-4), 131-314.
17. Srituravanich, W.; Fang, N.; Sun, C.; Luo, Q.; Zhang, X., Plasmonic Nanolithography. *Nano Letters* **2004**, 4 (6), 1085-1088.
18. Yang, F. Z.; Sambles, J. R.; Bradberry, G. W., Long range surface modes supported by thin films. *Phys. Rev. B* **1991**, 44 (11), 5855-5872.
19. Debruijn, H. E.; Kooyman, R. P. H.; Greve, J., Choice of metal and wavelength for surface plasmon resonance sensors - Some considerations. *Appl. Opt.* **1992**, 31 (4), 440-442.

20. Homola, J.; Yee, S. S.; Gauglitz, G., Surface plasmon resonance sensors: review. *Sens. Actuator B-Chem.* **1999**, *54* (1-2), 3-15.
21. Live, L. S.; Murray-Méthot, M.-P.; Masson, J.-F., Localized and Propagating Surface Plasmons in Gold Particles of Near-Micron Size. *The Journal of Physical Chemistry C* **2009**, *113* (1), 40-44.
22. Bolduc, O. R.; Live, L. S.; Masson, J. F., High-resolution surface plasmon resonance sensors based on a dove prism. *Talanta* **2009**, *77* (5), 1680-1687.
23. Forest, S. Développement d'une méthode SPRi-MALDI-IMS pour la quantification et l'identification des protéines dans des empreintes de tissus biologiques. Université de Montréal, 2015.
24. Aubé, A. Développement de chimie de surface pour la réduction de l'adsorption non-spécifique de lysat cellulaire et application clinique de biocapteurs SPR. Université de Montréal, 2016.
25. Couture, M.; Zhao, S. S.; Masson, J. F., Modern surface plasmon resonance for bioanalytics and biophysics. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15* (27), 11190-11216.
26. Hoa, X. D.; Kirk, A. G.; Tabrizian, M., Towards integrated and sensitive surface plasmon resonance biosensors: A review of recent progress. *Biosensors and Bioelectronics* **2007**, *23* (2), 151-160.
27. Murphy, M. B.; Fuller, S. T.; Richardson, P. M.; Doyle, S. A., An improved method for the in vitro evolution of aptamers and applications in protein detection and purification. *Nucleic Acids Research* **2003**, *31* (18), e110-e110.
28. Thorpe, R.; Swanson, S. J., Current Methods for Detecting Antibodies against Erythropoietin and Other Recombinant Proteins. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* **2005**, *12* (1), 28-39.

29. García-Ojeda, P. A.; Hardy, S.; Kozlowski, S.; Stein, K. E.; Feavers, I. M., Surface Plasmon Resonance Analysis of Antipolysaccharide Antibody Specificity: Responses to Meningococcal Group C Conjugate Vaccines and Bacteria. *Infection and Immunity* **2004**, 72 (6), 3451-3460.
30. Wilson, S.; Howell, S., High-throughput screening in the diagnostics industry. *Biochemical Society Transactions* **2002**, 30 (4), 794.
31. Carrasco, C.; Rosu, F.; Gabelica, V.; Houssier, C.; De Pauw, E.; Garbay-Jaureguiberry, C.; Roques, B.; Wilson, W. D.; Chaires, J. B.; Waring, M. J.; Bailly, C., Tight Binding of the Antitumor Drug Ditercalinium to Quadruplex DNA. *ChemBioChem* **2002**, 3 (12), 1235-1241.
32. Carrasco, C.; Vezin, H.; Wilson, W. D.; Ren, J.; Chaires, J. B.; Bailly, C., DNA binding properties of the indolocarbazole antitumor drug NB-506. *Anti-cancer drug design* **2001**, 16 (2-3), 99-107.
33. Gambari, R.; Feriotto, G.; Rutigliano, C.; Bianchi, N.; Mischiati, C., Biospecific Interaction Analysis (BIA) of Low-Molecular Weight DNA-Binding Drugs. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **2000**, 294 (1), 370.
34. Rich, R. L.; Hoth, L. R.; Geoghegan, K. F.; Brown, T. A.; LeMotte, P. K.; Simons, S. P.; Hensley, P.; Myszka, D. G., Kinetic analysis of estrogen receptor/ligand interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2002**, 99 (13), 8562-7.
35. Lansiaux, A.; Tanious, F.; Mishal, Z.; Dassonneville, L.; Kumar, A.; Stephens, C. E.; Hu, Q.; Wilson, W. D.; Boykin, D. W.; Bailly, C., Distribution of Furamidine Analogues in Tumor Cells. *Cancer Research* **2002**, 62 (24), 7219.

36. Mandine, E.; Gofflo, D.; Jean-Baptiste, V.; Sarubbi, E.; Touyer, G.; Deprez, P.; Lesuisse, D., Src homology-2 domain binding assays by scintillation proximity and surface plasmon resonance. *Journal of molecular recognition : JMR* **2001**, *14* (4), 254-60.
37. Nedelkov, D.; Rasooly, A.; Nelson, R. W., Multitoxin biosensor-mass spectrometry analysis: a new approach for rapid, real-time, sensitive analysis of staphylococcal toxins in food. *International journal of food microbiology* **2000**, *60* (1), 1-13.
38. Bokken, G. C. A. M.; Corbee, R. J.; Knapen, F.; Bergwerff, A. A., Immunochemical detection of Salmonella group B, D and E using an optical surface plasmon resonance biosensor. *FEMS Microbiology Letters* **2003**, *222* (1), 75-82.
39. Homola, J.; Vaisocherova, H.; Dostalek, J.; Piliarik, M., Multi-analyte surface plasmon resonance biosensing. *Methods* **2005**, *37* (1), 26-36.
40. Remy-Martin, F.; El Osta, M.; Lucchi, G.; Zeggari, R.; Leblois, T.; Bellon, S.; Ducoroy, P.; Boireau, W., Surface plasmon resonance imaging in arrays coupled with mass spectrometry (SUPRA-MS): proof of concept of on-chip characterization of a potential breast cancer marker in human plasma. *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, *404* (2), 423-432.
41. Zhou, W.; Yang, M.; Li, S.; Zhu, J., Surface plasmon resonance imaging validation of small molecule drugs binding on target protein microarrays. *Applied Surface Science* **2018**, *450*, 328-335.
42. Turner, A. P. F. Biosensors and Bioelectronics. <https://www.journals.elsevier.com/biosensors-and-bioelectronics>.
43. Bolduc, O. R. Monocouches peptidiques auto-assemblées et applications dans le domaine des biocapteurs de résonance de plasmon de surfaces. Université de Montréal, Montréal, 2011.

44. Ratel, M.; Provencher-Girard, A.; Zhao, S. S.; Breault-Turcot, J.; Labrecque-Carbonneau, J.; Branca, M.; Pelletier, J. N.; Schmitzer, A. R.; Masson, J.-F., Imidazolium-Based Ionic Liquid Surfaces for Biosensing. *Anal. Chem.* **2013**, 85 (12), 5770-5777.
45. Ulman, A., Formation and Structure of Self-Assembled Monolayers. *Chem. Rev.* **1996**, 96 (4), 1533-1554.
46. Pensa, E.; Cortés, E.; Corthey, G.; Carro, P.; Vericat, C.; Fonticelli, M. H.; Benítez, G.; Rubert, A. A.; Salvarezza, R. C., The Chemistry of the Sulfur–Gold Interface: In Search of a Unified Model. *Accounts of Chemical Research* **2012**, 45 (8), 1183-1192.
47. Aube, A.; Breault-Turcot, J.; Chaurand, P.; Pelletier, J. N.; Masson, J. F., Non-specific Adsorption of Crude Cell Lysate on Surface Plasmon Resonance Sensors. *Langmuir* **2013**, 29 (32), 10141-10148.
48. Bolduc, O. R.; Lambert-Lanteigne, P.; Colin, D. Y.; Zhao, S. S.; Proulx, C.; Boeglin, D.; Lubell, W. D.; Pelletier, J. N.; Féthière, J.; Ong, H.; Masson, J.-F., Modified peptide monolayer binding His-tagged biomolecules for small ligand screening with SPR biosensors. *Analyst* **2011**, 136 (15), 3142-3148.
49. Mattson, G.; Conklin, E.; Desai, S.; Nielander, G.; Savage, M. D.; Morgensen, S., A practical approach to crosslinking. *Molecular Biology Reports* **1993**, 17 (3), 167-183.
50. Seeley, E. H.; Caprioli, R. M., MALDI imaging mass spectrometry of human tissue: method challenges and clinical perspectives. *Trends in biotechnology* **2011**, 29 (3), 136-143.
51. Thermofisher <https://www.thermofisher.com/ca/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-immunohistochemistry.html>.

52. Matos, L. L.; Trufelli, D. C.; de Matos, M. G.; da Silva Pinhal, M. A., Immunohistochemistry as an important tool in biomarkers detection and clinical practice. *Biomarker insights* **2010**, *5*, 9-20.
53. Jensen, K.; Krusenstjerna-Hafstrøm, R.; Lohse, J.; Petersen, K. H.; Derand, H., A novel quantitative immunohistochemistry method for precise protein measurements directly in formalin-fixed, paraffin-embedded specimens: analytical performance measuring HER2. *Modern Pathology* **2016**, *30*, 180.
54. Hillenkamp, F.; Unsöld, E.; Kaufmann, R.; Nitsche, R., A high-sensitivity laser microprobe mass analyzer. *Applied physics* **1975**, *8* (4), 341-348.
55. Karas, M.; Bachmann, D.; Hillenkamp, F., Influence of the wavelength in high-irradiance ultraviolet laser desorption mass spectrometry of organic molecules. *Anal. Chem.* **1985**, *57* (14), 2935-2939.
56. Posthumus, M. A.; Kistemaker, P. G.; Meuzelaar, H. L. C.; Ten Noever de Brauw, M. C., Laser desorption-mass spectrometry of polar nonvolatile bio-organic molecules. *Anal. Chem.* **1978**, *50* (7), 985-991.
57. Karas, M.; Hillenkamp, F., Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10 000 daltons. *Anal. Chem.* **1988**, *60* (20), 2299-2301.
58. Zenobi, R.; Knochenmuss, R., Ion formation in MALDI mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* **1998**, *17* (5), 337-366.
59. Caprioli, R. M.; Farmer, T. B.; Gile, J., Molecular Imaging of Biological Samples: Localization of Peptides and Proteins Using MALDI-TOF MS. *Anal. Chem.* **1997**, *69* (23), 4751-4760.

60. Stoeckli, M.; Chaurand, P.; Hallahan, D. E.; Caprioli, R. M., Imaging mass spectrometry: A new technology for the analysis of protein expression in mammalian tissues. *Nature Medicine* **2001**, 7, 493.
61. Cornett, D. S.; Reyzer, M. L.; Chaurand, P.; Caprioli, R. M., MALDI imaging mass spectrometry: molecular snapshots of biochemical systems. *Nature Methods* **2007**, 4, 828.
62. McDonnell, L. A.; Heeren, R. M. A., Imaging mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews* **2007**, 26 (4), 606-643.
63. Porta, T.; Lesur, A.; Varesio, E.; Hopfgartner, G., Quantification in MALDI-MS imaging: what can we learn from MALDI-selected reaction monitoring and what can we expect for imaging? *Anal. Bioanal. Chem.* **2015**, 407 (8), 2177-2187.
64. Groseclose, M. R.; Castellino, S., A Mimetic Tissue Model for the Quantification of Drug Distributions by MALDI Imaging Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2013**, 85 (21), 10099-10106.
65. Seeley, E. H.; Oppenheimer, S. R.; Mi, D.; Chaurand, P.; Caprioli, R. M., Enhancement of protein sensitivity for MALDI imaging mass spectrometry after chemical treatment of tissue sections. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2008**, 19 (8), 1069-1077.
66. Horiba <http://www.horiba.com/>.
67. Bolduc, O. R.; Pelletier, J. N.; Masson, J.-F., SPR Biosensing in Crude Serum Using Ultralow Fouling Binary Patterned Peptide SAM. *Anal. Chem.* **2010**, 82 (9), 3699-3706.
68. Fournaise, E.; Chaurand, P., Increasing specificity in imaging mass spectrometry: high spatial fidelity transfer of proteins from tissue sections to functionalized surfaces. *Anal. Bioanal. Chem.* **2015**, 407 (8), 2159-2166.

69. Couture, M.; Liang, Y.; Poirier Richard, H.-P.; Faïd, R.; Peng, W.; Masson, J.-F., Tuning the 3D plasmon field of nanohole arrays. *Nanoscale* **2013**, *5* (24), 12399-12408.
70. Couture, M.; Brulé, T.; Laing, S.; Cui, W.; Sarkar, M.; Charron, B.; Faulds, K.; Peng, W.; Canva, M.; Masson, J.-F., High Figure of Merit (FOM) of Bragg Modes in Au-Coated Nanodisk Arrays for Plasmonic Sensing. *Small* **2017**, *13* (38), 1700908.

Chapitre 5 Annexe

5.1 Dimensions des prismes utilisés

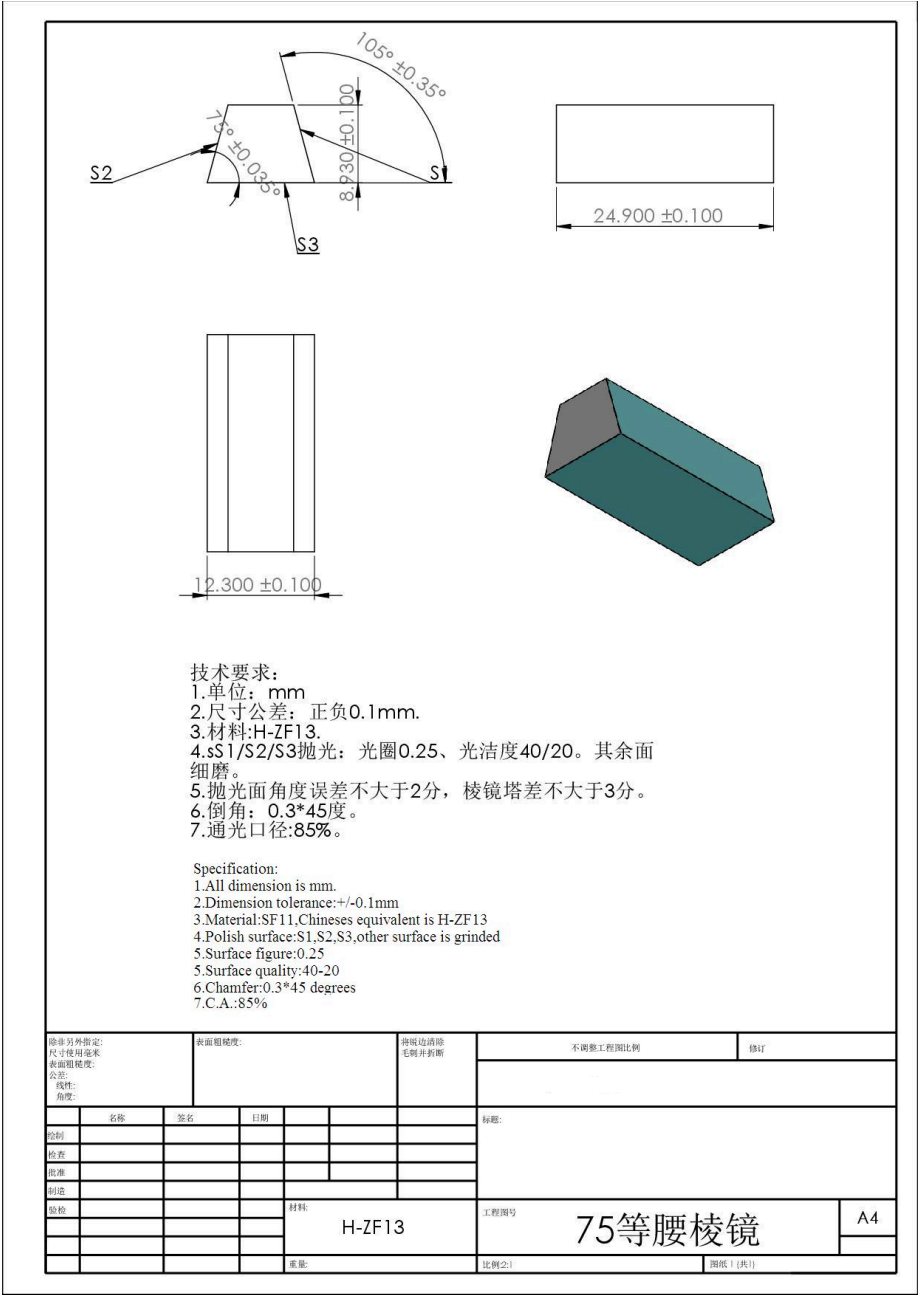


Figure 53. Schéma des prismes utilisé dans l'instrument d'imagerie SPR.

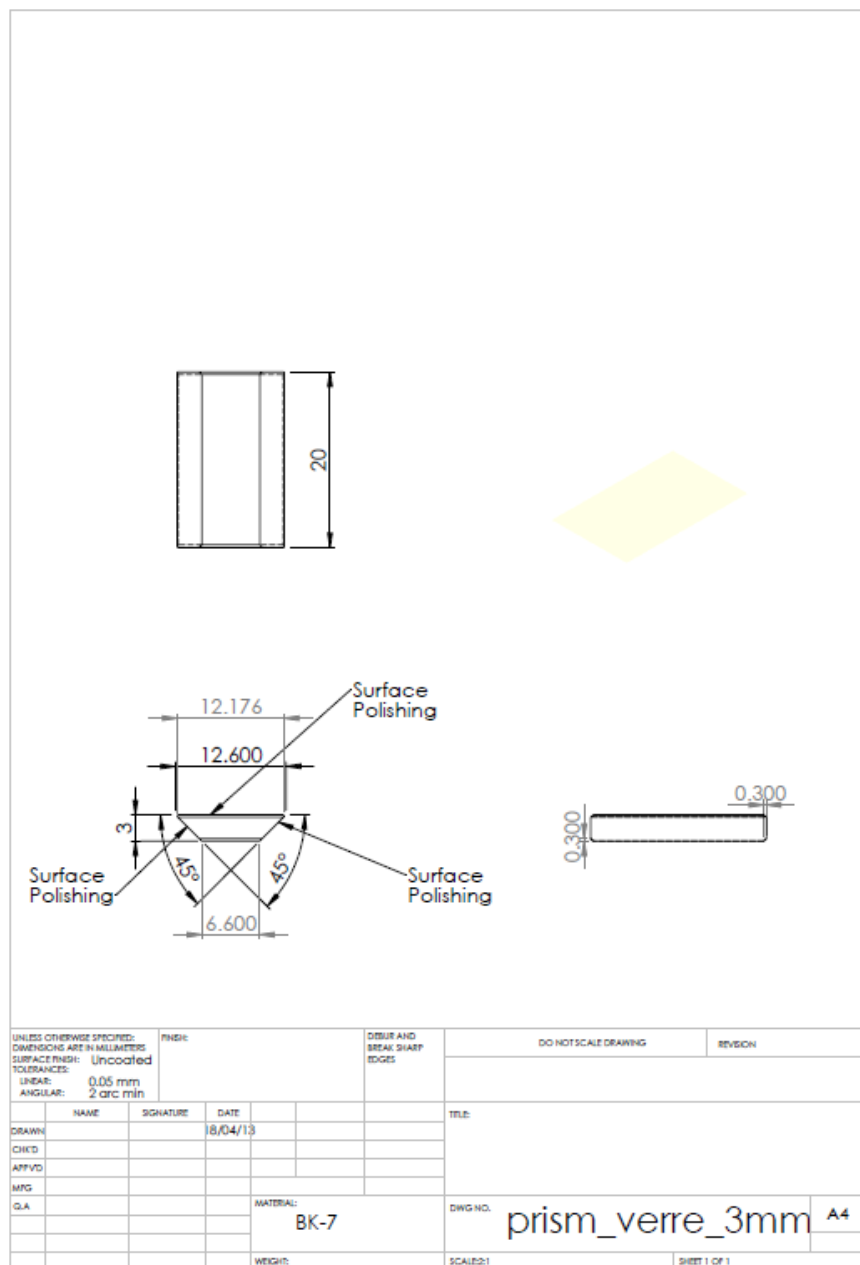


Figure 54. Schémas des prismes utilisés dans l'instrument P4 SPR.

5.2 Plans et dimensions de la cellule fluide indépendante

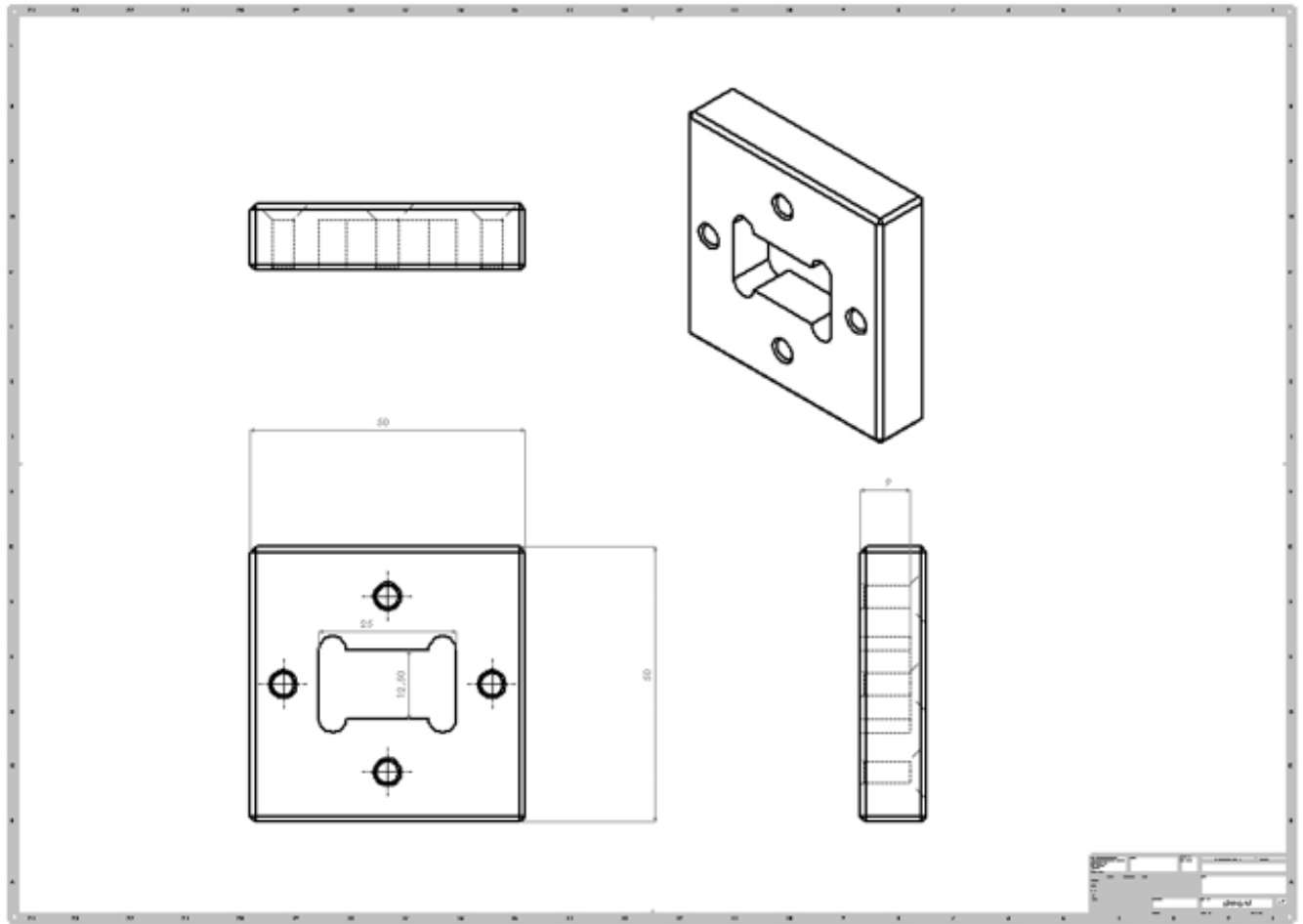


Figure 55. Plans et dimensions de la partie inférieure de la cellule fluide indépendante.

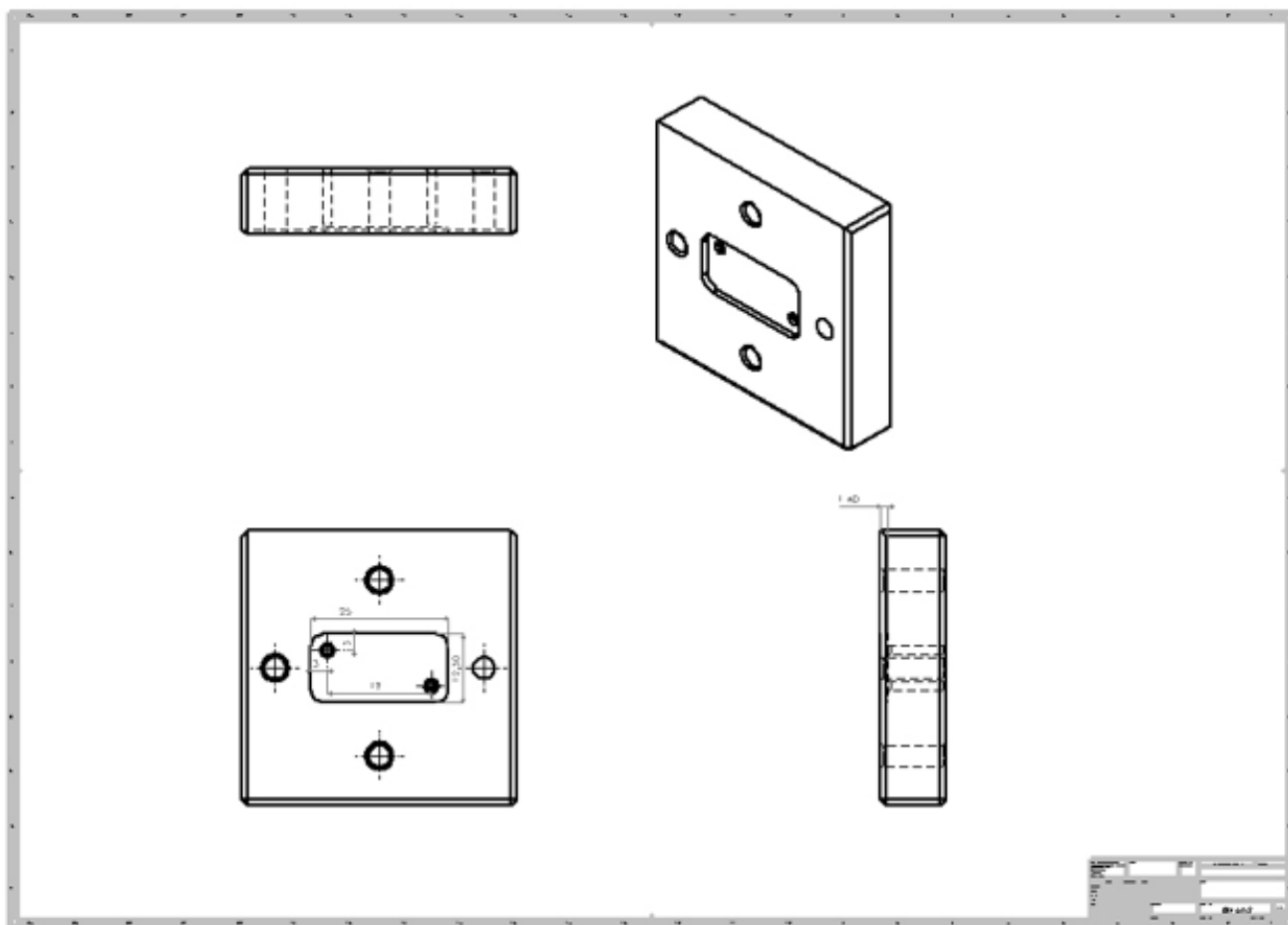


Figure 56. Plans et dimensions de la partie supérieure de la cellule fluidique indépendante.

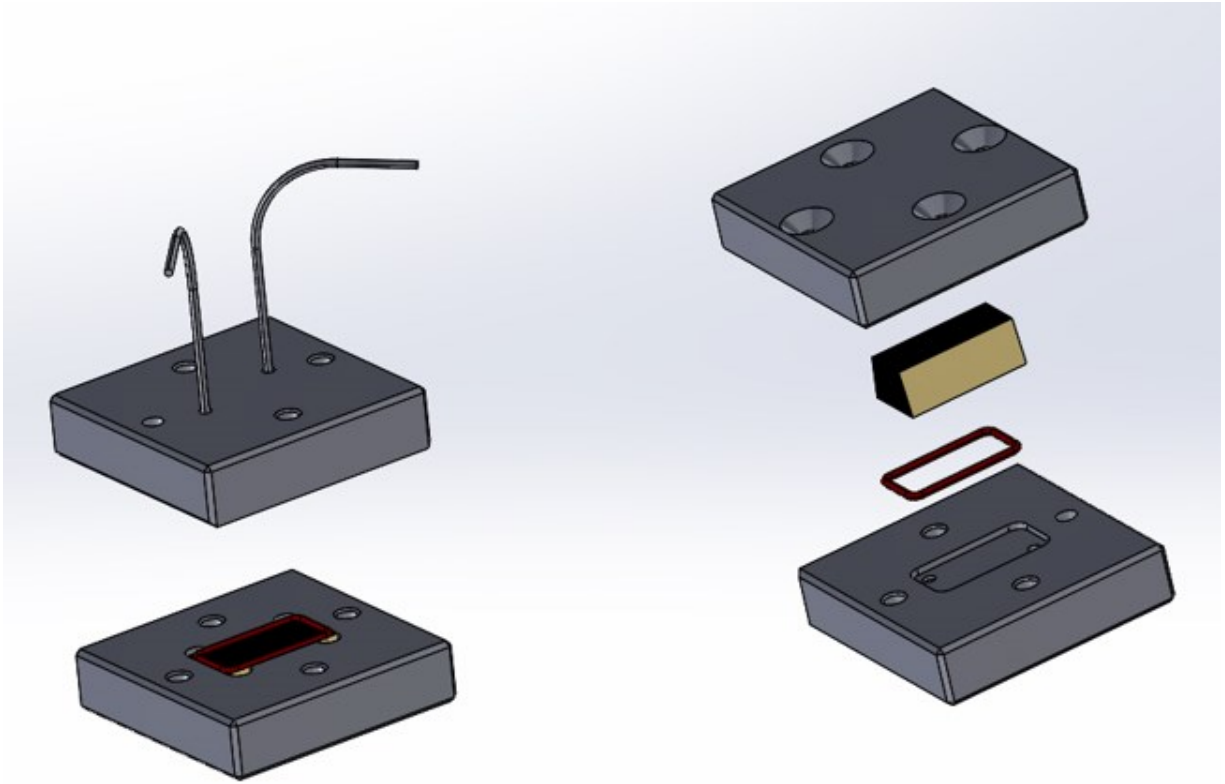


Figure 57. Assemblage de la cellule fluide indépendante.

5.3 Codes Matlab utilisés pour le traitement des données d'imagerie SPR

Premièrement, le scan de référence est obtenu de la façon suivante : toutes les images acquises par l'imageur (P1 et P2) sont insérées dans un même dossier, en plus des fichiers de code *Minpixhunthr* et *SPRi_Process*. La série de données *Plasmon Curves.txt* est téléchargée dans l'espace de travail Matlab, et renommée *theta*. Le code *SPRi_Process* est alors lancé, et en résulte l'image de référence, appelée *SPR_Image_1*. Deuxièmement, le scan de transfert est obtenu de la même façon que pour le scan de référence, et l'image obtenue est appelée *SPR_Image_2*. Enfin, l'image finale en ng/cm^2 est obtenue en effectuant le code *ImageMasse*, et est nommée *ImageSPRmasse*. Une fois l'image finale obtenue, le code *Moyenne* est utilisé afin d'effectuer la somme des masses mesurées.

5.3.1 Code Minpixhunthr

```
function [mins, pixs, Y]=minpixhunthr(A, angle);
%wavel=([1:1:1024].*0.0324+647)';
wavel=angle;
[m, n]=size(A);
count=1;
pixel=[1:1:100]';
countr=1;
mins=[];
for i=1:1:n
    [mn, indx]=min(A(:, i));
    %[startp, endp]=fpnts(A(:, i), mn, indx);
    [startp]=1;
    [endp]=100;
    dip=A(startp:endp, i);
    wavdip=pixel(startp:endp);
    p=polyfit(wavdip, dip, 2);
    pp=polyder(p);
    min1=roots(pp);
    mins=[mins, min1];
end;
pixs=round(mins);
[m, n]=size(A);
Y=[];
for j=1:1:n
    [mn, indx]=min(A(:, j));
    %[stp, enp]=fpnts(A(:, j), mn, pixs(j));
    [stp]=1;
    enp=100;
    dip=A(stp:enp, j);
    wavdip=wavel(stp:enp);
    p=polyfit(wavdip, dip, 2);
    ppv=polyval(p, wavdip);
    pp=polyder(p);
    Y=[Y; ppv];
    mins(:, j)=roots(pp);
    countr=countr+1;
end;

function [sp, ep]=fpnts(M, mn1, indx1)
p=mn1;
ep=indx1;
sp=indx1;
while p<1.3.*mn1
    p=M(ep);
    ep=ep+1;
end;

p=mn1;
while p<1.3.*mn1
    p=M(sp);
    sp=sp-1;
end;
```

5.3.2 Code SPRi_Process

```
function [SPR_image_1] = process_SPRi(theta)

for k = 1:1:100
    jpgFilename = strcat('P2_', num2str(k), '.tif');
    S(:,:,k) = imread(jpgFilename);
end

for k = 1:1:100
    jpgFilename = strcat('P1_', num2str(k), '.tif');
    P(:,:,k) = imread(jpgFilename);
end

P = double(P);
S = double(S);
rat = P./S;

B = permute(rat,[3,1,2]);

for i = 1:1:576
    [mins]=minpixhunthr(B(:,:,i),theta);
    SPR_image_1(:,i) = mins';
end
figure
imagesc(SPR_image_1)
```

5.3.3 Code ImageMasse

```
ImageSPR = SPR_image_2-SPR_image_1;
ABSImageSPR = abs(ImageSPR);
NEGImageSPR = -ABSImageSPR;
ImageSPRmasse = 230e-7 * log10(1-(NEGImageSPR/31.179))*1.3*1e9;
imagesc(ImageSPRmasse)
```

5.3.4 Code Moyenne

```
for i = 1 : size(ImageSPRmasse, 1);
    for j = 1 : size(ImageSPRmasse, 2);
        if ImageSPRmasse(i,j) > 1000;
            ImageSPRmasse(i,j) = 0;
        end
    end
end
```

```
end
```

```
Somme = sum(sum(ImageSPRmasse));  
imagesc(ImageSPRmasse)
```

